RADIOREZEPTORASSAY FÜR PROLAKTIN MIT LEBERZELLMEMBRANEN DER RATTE

Brigitte Wiedemann
Günzburg 1980

Aus der Medizinischen Klinik
Innenstadt der Universität München
Direktor: Prof.Dr.med.E. Buchborn

RADIOREZEPTORASSAY FÜR PROLAKTIN MIT LEBERZELLMEMBRANEN DER RATTE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Brigitte Wiedemann

aus Günzburg

1980

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft
(SFB 51)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Priv.Doz.Dr.med.K.v.Werder
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.E.Buchborn
Dekan:	Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 2.10.1980

Meinen Eltern

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1. Einleitung
2. Methoden
2.1. Präparation von Leberzellplasmamembranen
2.1.1. Präparation nach Tsushima und Friesen
2.1.1.1. Zentrifugation
2.1.1.2. Enzymteste
2.1.1.2.1. 5'-Nukleotidase-Test
2.1.1.2.2. Spezifischer 5'-Nukleotidase-Test
2.1.1.2.3. Citrat-Synthase-Test
2.1.1.2.4. NADPH-Cytochrom-C-Reduktase-Test
2.1.1.2.5. Glucose-6-Phosphatase-Test
2.1.1.2.6. Proteinbestimmung nach Lowry
2.1.2. Präparation von Leberzellplasmamembranen nach Ray, modifiziert (Kaninchenleber, Rattenleber)
2.1.2.1. Zentrifugation
2.1.2.2. Herstellung eines Dichtegradienten mit Saccharose nach Ray
2.1.2.2.1. Refraktometer
2.1.2.2.2. Bildung eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten und Nachweis der Linearität mit Nilblausulfat und Brechungsindex. Anwendung des linearen Gradienten zum Auftrennen der subzellulären Fraktionen.
2.1.2.2.2.1. Kontinuierliche Saccharose-Dichte-Gradienten von R_3, Schicht I und Schicht II
2.2. Präparation eines ^{125}J-Prolaktin-Tracers
2.2.1. Präparation des ^{125}J-Prolaktin-Tracers mit Chloramin-T nach Greenwood, Hunter
2.2.1.1. Isotopen
2.2.1.2. Jodierung
2.2.2. Präparation des ^{125}J-Prolaktin-Tracers mit Lactoperoxidase nach Thorell, Johannson

2.2.2.1. Jodierung

2.2.3. Radioimmunoassay für humanes Prolaktin

2.3. Aufbau eines Radiorezeptorassays für Prolaktin

2.3.1. Bindung von ^{125}J-Prolaktin an die Schichten I-IV des diskontinuierlichen Gradienten

2.3.2. Vergleich der Bindung des ^{125}J-Prolaktin Tracers markiert nach der Chloramin-T-Methode, der Lactoperoxidase Methode und des 100000g-Rückstands der Präparation nach Friesen mit der Bindung an die Schicht II des diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten

2.3.3. Kinetik

2.3.3.1. Kinetik der Rattenleberpräparation

2.3.3.2. Kinetik der Kaninchenleberpräparation

2.3.4. Interferenzkurve der Kaninchenleberpräparation

2.3.5. Standardkurve der Rattenleberpräparation

2.3.6. Sättigungskurve der Rattenleberpräparation

2.3.7. Kreuzreaktionen der Rattenleberpräparation

2.3.8. Scatchard-Plot der Rattenleberpräparation

3. Ergebnisse

3.1. Saccharose-Eichkurve

3.2. Kontinuierliche Saccharose-Dichte-Gradienten

3.2.1. Nachweise der Linearität des Saccharose-Dichte-Gradienten mit Nilblausulfatverdünnung und Brechungsindex

3.2.2. Proteinverteilung der Fraktion R_3 entlang eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten von 46% bis 20%.

3.2.3. Verteilung des Peaks 2 entlang eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten von 48% bis 32%

3.2.4. Verteilung der Schicht I des diskontinuierlichen Gradienten entlang eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten von 39% bis 28%.

3.2.5. Verteilung der Schicht II des diskontinuierlichen Gradienten entlang eines kontinuierlichen Gradienten von 40% bis 35%

3.3. Enzymteste

3.3.1. Proteinbestimmung nach Lowry

3.3.2. 5'-Nukleotidase
3.3.3. NADPH¬Cytochrom-C-Reduktase
3.3.4. Glucose-6-Phosphatase
3.3.5. Citrat-Synthase
3.3.6. 5'-Nukleotidase-Test für die Rattenleberpräparation
3.3.7. NADPH-Cytochrom-C-Reduktase-Test für die Rattenleberpräparation
3.3.8. Citrat-Synthase-Test für die Rattenleberpräparation
3.5. Rezeptorcharakterisierung für Prolaktin
3.5.1. Bindung von ^{125}J-Prolaktin an die Schichten I-IV des diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten
3.5.2. Vergleich der Bindung von ^{125}J-Prolaktin-Racern
3.5.3. Kinetik
3.5.4. Assoziation von hPRL an die Leberplasmamembranen
3.5.4.1. Assoziation von hPRL an Kaninchenplasmamembranen
3.5.4.2. Assoziation von hPRL an Rattenplasmamembranen
3.5.5. Standardkurve der Rattenplasmamembranen
3.5.6. Sattigungskurve der Rattenplasmamembranen
3.5.7. Satchard Plot der Rattenplasmamembranen
3.5.8. Interferenzkurven
3.5.8.1. Interferenzkurve der Kaninchenmikrosomen
3.5.8.2. Interferenzkurve der Rattenmikrosomen
4. Diskussion
4.1. Präparation von Leberzellplasmamembranen und Qualitätsnachweis durch Enzymteste und Elektronenmikroskopie
4.1.1. Präparationsmethoden
4.1.2. Enzymteste
4.1.3. Elektronenmikroskopie
4.2. ^{125}J-Prolaktin-Tracer markiert mithilfe von Chloramin-T oder Lactoperoxidase
4.3. Eigenschaften des hPRL-Rezeptors (nach Cuatrecasas)
4.3.1. Bindung und Bindungskinetik
4.3.2. Spezifität und Reversibilität der Bindung
4.3.3. Sättigbarkeit
5. Zusammenfassung
6. Literaturverzeichnis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535726_0029

A B K Ü R Z U N G E N

ACTH = Adrenocorticotropes Hormon
AK = Antikörper
AMP = Adenosin-5'-Monophosphat
APAD = Acetylpyridinadenindinucleotid
ATP = Adenosintriphosphat
BSA = Rinderalbumin
cpm = Counts per minute
CoA = Coenzym A
DNA = Desoxyribonukleinsäure
EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure
ER = Endoplasmatisches Retikulum
GA = Gesamtaktivität
GTP = Guanosin-Triphosphat
HEPES = N-2-Hydroxylpiperacin-2-äthansulfonsäure
hGH = human Growth Hormone
hPL = human Placenta Lactogen
hPRL = human Prolactin
LPO = Laktoperoxidase
MDH = Malatdehydrogenase
NADP = Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NNR = Nebennierenrinde
oPRL = ovines Prolaktin
PIF = Prolactin-Inhibiting-Factor
PM = Plasmamembranen
RIA = Radioimmunoassay
RNA = Ribonukleinsäure
RRA = Radiorezeptorassay
SDS = Dodecylsulfat-Na Salz
TRH = Thyreotropin-Releasing Hormone
VLS = von VANDERLAAN, LEWIS und SINHA gereinigtes Prolaktin (National Institute of Health, Bethesda, Md.)

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1: Zentrifugationsschritte zur Präparation von Leberplasmamembranen, modifiziert nach Tsuschima, Friesen, Posner

Abb. 2: Zentrifugationsschritte zur Präparation von Leberzellplasmamembranen nach Ray, modifiziert

Abb. 3: Schematische Darstellung eines Gradientenformers

Abb. 4: Diskontinuierlicher Saccharosedichtegradient

Abb. 5: Zentrifugenröhrchen nach der Zentrifugation

Abb. 6: Saccharose-Eichkurve

Abb. 7: Extinktion der 1 ml-Fraktion eines Saccharose-Dichte-Gradienten, gemessen im Eppendorf-Photometer

Abb. 8: Refraktometerwerte der 1 ml-Fraktion

Abb. 9: Proteinverteilung entlang eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten von 46-20%, gemessen im UV-Photometer bei 280 nm

Abb.10: Proteinverteilung des Peak 2 entlang eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten von 48-32%, gemessen im UV-Photometer bei 280 nm

Abb.11: Proteinverteilung der Schicht I des diskont. Gradienten entlang eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten von 39-28%, gemessen im UV-Photometer bei 280 nm

Abb.12: Proteinverteilung der Schicht II des diskont. Gradienten entlang eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten von 40-35%, gemessen im UV-Photometer bei 280 nm

Abb.13: Albumin-Standardkurve

Abb.14: 5'-Nukleotidase Test nach Nathan, Aronson. Linear steigende Bildung von Phosphat bei Einsatz von steigenden Mengen der Schicht II eines diskont. Saccharose-Dichte-Gradienten

Abb.15: Elektronenmikroskopie der Schicht II (Rattenleber)

Abb.16: Bindung von ^{125}J-Prolaktin an die Schichten I-IV (Kaninchenleber)

Abb.17: Bindung des ^{125}J-Prolaktin Tracers (Chloramin-T- und LPO-Methode) an die 100000g-Fraktion und an unsere Schicht II

Abb.18: Bindung des ^{125}J-Prolaktin Tracers an die Schicht II bei 30°C (Kaninchenleber)

Abb.19: Bindung von ^{125}J-Prolaktin an die Schicht II bei 4°C, bei 28°C, bei 30°C und bei 37°C (Rattenleber)

Abb.20: hPRL-Standardkurve (Rattenleber)

Abb.21: Sättigungskurve (Rattenleber)

Abb.22: Scatchard-Plot der Standardkurve (Rattenleber)

Abb.23: Kreuzreaktion der Prolaktin Rezeptoren von Kaninchen mit hGH

Abb.24: Kreuzreaktion der Prolaktin Rezeptoren von Rattenlebern mit hGH und hPL

1. Einleitung

1.1. Struktur von Prolaktin

Erst 1970 ergab sich der Beweis, daß neben einem wachstumsfördernden Hormon (human growth hormone) in der menschlichen Hypophyse ein zweites, nicht glandotropes Hormon gebildet wird, das für die Laktation wichtig ist: Frantz und Kleinberg (48) fanden mithilfe eines sensitiven Bioassays im menschlichen Blut ein von hGH separates Prolaktin. Die Trennung beider Hormone ist Hummel et al (41) in Affen- und Menschenhypophysen gelungen. 1972 hat Pasteels (32) erstmals in Gewebekulturen menschlicher Hypophysen Prolaktin gereinigt.

Prolaktin wird in den acidophilen Hypophysenvorderlappen-Zellen gebildet. Es ist ein einkettiges Peptidhormon mit einem Molekulargewicht um 22000. Identische Abschnitte der Aminosäurensequenz (72,30,6,75) mit hGH geben zu der Hypothese Anlaß, daß ihre Entwicklung aus einem gemeinsamen "Urpeptid" erfolgt ist (1). Ebenso sind die biologischen Aktivitäten beider Hormone nicht völlig zu trennen, auch hGH-Präparationen zeigen echte laktotrope Aktivität (100) und das von Li et al (68) synthetisierte Protein wirkt wachstumsfördernd (jedoch nur 10% der hGH-Bioaktivität) und laktogen.

Die Strukturanalyse von Li et al (69) hat für das oPRL 198 Aminosäuren ergeben, die durch 3 Disulfidbrücken stabilisiert sind. Nur 26% der Aminosäuren sind mit hGH homolog. Dagegen stimmt ein in der Gravidität vom menschlichen Syncytiotrophoblasten gebildetes Hormon (human placenta lactogen, human chorionic somato mammotropin) trotz abweichender Wirkung zu 96% in der Sequenz mit hGH überein.(69)

Auffällig ist die unterschiedliche Speziesspezifität von hGH und hPRL: Beim Menschen wirkt nur Wachstumshormon von Primaten. Bovines Wachstumshormon zeigt z.B. eine Strukturabweichung von 35% und hat ein Molekulargewicht von 40000. Bei Prolaktin bestehen z.B. zwischen ovinem und bovinem Prolaktin engste Strukturbeziehungen (70) und gegen oPRL gerichtete Antikörper können auch Prolaktin anderer Spezies binden.

1.2. Regulation der Sekretion

Prolaktin steht als einziges Hypophysenvorderlappenhormon im Gegensatz zu den anderen direkt wirkenden bzw. glandotropen Hormonen unter vorwiegend inhibitorischer Kontrolle (92). Die inhibitorische Kontrolle beruht auf dem Prolaktin-Inhibiting-Faktor (PIF), bei dem es sich wahrscheinlich um das biogene Amin, Dopamin, handelt (8). Neben dem Prolaktin-Inhibiting-Faktor gibt es auch Prolaktin stimulierende Faktoren. So führt das Thyreotropin-Releasing Hormon (TRH) zu einer Stimulation der laktotropen Zelle (105). Dies ergab zu der Diskussion Anlaß, ob das zur hPRL-Sekretion führende TRH mit dem Prolactin-Releasing-Hormone identisch ist (43). Der hPRL-Normalspiegel (unter 25ng/ml) steigt in der Schwangerschaft im 2.Trimenon über 50ng/ml, im 3. Trimenon über 134ng/ml und erreicht am Termin einen Gipfel von 200ng/ml. Vier Wochen postpartal werden normale hPRL-Spiegel gemessen. Oestrogene, Phenothiazine und Stress erhöhen den hPRL-Spiegel ebenso wie der Saugreiz an der Brust (20). Prolaktin steigert das Gewicht der Kropfdrüse der Taube (biologische Bestimmung) und führt beim Säuger zur Reifung der azinären Drüsenzellen der Mammae und zum Beginn der Milchsekretion für deren Erhaltung jedoch Oxytocin notwendig ist.

1.3. Untersuchung der hPRL-Sekretion in der Klinik

1.3.1. Stimulationstest

1.3.1.1. TRH soll direkt auf die Hypophyse wirken (8,43). Oestrogenspiegel und Schilddrüsenfunktion beeinflussen den hPRL-Anstieg, das Thyreotropin-Releasing-Hormon TRH führt zu einer Stimulation der lactotropen Zelle (105).

1.3.1.2. Chlorpromazin führt wahrscheinlich über hypothalamische PIF-Hemmung zu einem hPRL-Anstieg (49). Dies wurde aus der Beobachtung der Galaktorrhoe bei psychiatrischer Langzeitbehandlung mit Phenothiazinen abgeleitet.

1.3.2. Suppressionstest

1.3.2.1.0,5g L-Dopa führen nach 90-120 min zu einem Abfall des hPRL-Spiegels. L-Dopa blockiert die stimulierende Wirkung von Chlorpromazin, aber auch von TRH (78), was auf PIF-Beein-

flussung hindeutet (49). Apomorphin wirkt wie Dopamin, das vielleicht mit PIF identisch ist (73).

1.3.2.2. Das Ergotalkaloid (2-Br-α-ergocryptin) CP-154 (Pravidel) senkt anhaltender als L-Dopa (74) den hPRL-Spiegel, weshalb es auch zur Langzeittherapie von Hyperprolaktinämien geeignet ist. Es handelt sich um einen Dopaminagonisten und greift direkt an der Hypophyse an (19), wirkt aber auch indirekt über den Hypothalamus (73).

1.4. Pathologie

Wie sich in den letzten Jahren herausgestellt hat, ist der Prolaktin-produzierende Tumor der Hypophyse der häufigste Hypophysentumor überhaupt (49). Aber auch Wachstumshormon-produzierende oder endokrin inaktive Tumoren können von einer Hyperprolaktinämie begleitet sein (=nicht puerperales Galaktorrhoe-Amenorrhoe-Syndrom) und ist durch eine Hyperprolaktinämie verursacht. Letztere kann die Folge eines hPRL-produzierenden Hypophysentumors sein. (Prolaktinom). Bei endokrin inaktiven Tumoren ist die Quelle der vermehrten Prolaktinsekretion nicht der Tumor selbst, sondern die Resthypophyse, die durch portale Okklusion des supraselläre extendierenden Tumors von der inhibitorischen hypothalamischen Kontrolle enthemmt ist und somit vermehrt Prolaktin bildet. Als weitere Ursachen der Hyperprolaktinämie können sein:

1. Prolaktin-produzierendes Adenom mit Sellavergrößerung
2. Prolaktin-produzierendes Mikroadenom ohne Sellavergrößerung
3. Supraselläre wachsender Hypophysentumor, der durch Okklusion des Portalsystems zur Hemmung des Transports von PIF zum HVL führt.
4. Supraselläre Tumor (z.B. Craniopharyngeom) mit Störung der PIF-Bildung
5. Hypophysenstieldurchtrennung
6. Pharmaka (z.B. Phenothiazine) hemmen die PIF-Sekretion
7. Vermehrte Sekretion hypothalamischer Faktoren mit PRL-Aktivität (z.B. TRH bei primärer Hypothyreose).

Da die biologischen Bestimmungen (Taubenkropfsack-Test) entweder zu unempfindlich sind oder aber technisch zu aufwendig (Bestimmung des radioaktiven Phosphateinbaus in Casein, cytochemische Endbestimmungen) haben sie seit der Anwendung des von Yalow und Berson 1960 für Insulin entdeckten radioimmunologischen Bestimmungsprinzips (106) auch für Prolaktin und Wachstumshormon nur noch für die Standardisierung von Hormonpräparationen eine gewisse Bedeutung.

Die radioimmunologische Bestimmung für Prolaktin hat größere Schwierigkeiten bereitet, so daß hier die Bioassays länger dominierten als beim Wachstumshormon. Durch die Zweifel an der Existenz eines eigenständigen hPRL und durch die wesentlich geringeren hPRL-Mengen in der Hypophyse war die Gewinnung standarisierten menschlichen Prolaktins erschwert. Die fehlende Artspezifität des Prolaktins hat jedoch heterologe radioimmunologische Assays zugelassen, wobei z.B. hPRL die Bindung eines markierten Schweineprolaktins am gegen ovines Prolaktin gerichteten Antikörper inhibiert (9,43). Nachdem Guyda und Friesen (38) Affenprolaktin gereinigt, Bryant et al (10) Antikörper gegen fetales Prolaktin aus Kulturen gezüchtet haben, berichten Sinha et al (99) von einem homologen hPRL-RIA, bei dem menschliches hypophysäres Prolaktin als Antigen verwendet wird. Mit der Gewinnung einer ausreichenden Menge reinen hPRLs aus der Hypophyse 1971 durch Lewis et al (54-60) ist ein homologer RIA für hPRL möglich geworden (99).

1.5.1. Prinzip des Radioimmunoassays RIA

Unmarkiertes Antigen und markiertes Antigen (=Tracer) konkurrieren an einem spezifischen Antikörper nach dem Massenwirkungsgesetz um die Bindung. Aus der Inhibition der Tracerbindung an den Antikörper durch bekannte Mengen unmarkierten Hormons kann eine Eichkurve erstellt werden. Aus der Tracerverdrängung kann auf die unbekannte Menge Antigen aus der Eichkurve geschlossen werden. Um nur den AK-gebunden Tracer aufgrund seiner Radioaktivität zu erfassen, ist eine Trennung des AK-Komplexes vom ungebundenen Hormon nötig.

Dazu wird eine Doppel-AK-Methode angewandt, wobei der Antikörper-Komplex mit dem gebundenen Hormon durch einen 2. Antikörper ausgefällt wird.

1.5.2. Radiorezeptorassay

Radiorezeptorassays sind Bestimmungsmethoden, die auf dem Prinzip der Verdrängung des eingesetzten markierten Hormons aus der Bindung an einen spezifischen Rezeptor durch unmarkiertes Hormon basieren (=Kompetitive Protein Bindungsassay). Zuerst wurde der Radiorezeptor für Peptidhormone von Lefkowitz, Roth und Pastan (61) verwendet, um ACTH-Spiegel im Serum zu messen. Sie verwendeten dabei ^{125}J-ACTH als Tracer und NNR-Tumorgewebe als Material für ihre Rezeptorbindungsstudien. Später wurden Radiorezeptorassays dieser Art für Wachstumshormon (64), laktogene Hormone (94) und Gonatropine (65) entwickelt (88). Vorausgesetzt, daß die spezifischen Bindungsstellen für Hormone an den subzellulären Fraktionen wirklich Rezeptoren sind und daß kein interferierender Faktor vorhanden ist (7,88), hat der Radiorezeptorassay den Vorteil, daß biologisch aktives Hormon gemessen wird und nicht wie im Radioimmunoassay Antigendeterminanten. Bei den Antigendeterminanten könnte es sich nicht nur um aktives Hormon, sondern auch um inaktives Prohormon, um inaktive Polymeren oder inaktive Kataboliten handeln. Der Nachteil des Radiorezeptorassays liegt hauptsächlich darin, daß er für Artefakte sehr anfällig ist und daß es vorkommt, daß die Hormonbindungsstelle, obwohl spezifisch, keine Rezeptoren sind. Cuatrecasas und Hollenberg (15) entwickelten z.B. einen Insulin-Bindungs-Assay, in dem sie Talk als bindendes Agens verwendeten, der sicherlich keine Insulin Rezeptoren hat! Während die Rezeptordefinition ein begriffliches Problem ist und sich auf die derzeitige Definition stützt, nämlich daß die Bindung als Synonym für die biologische Aktivität angenommen wird, ist die Interferenz an der Bindungsstelle ein außerordentlich kompliziertes experimentelles Problem z.B. Hinweise, daß die Anwesenheit von GTP im RRA für Glukagon bei Verwendung von Leberplasmamembranen, die Gegenwart von Ca^{2+} im RRA für ACTH bei Verwendung von Nebennierenrindengewebe und die Anwesenheit von Proteasen, Peptidasen und Phospholipasen in jedem RRA, als hormonpositive Verdrängung interpretiert werden kann. GTP verringert die radioaktive Bindung von Glukagon (89), Ca^{2+} verhält sich gegenüber ACTH ähnlich (63), Peptidasen und Proteasen zerstören markiertes Hormon und Phospholipasen verändern

häufig entweder direkt oder indirekt die Rezeptor enthaltenden Membranen, im Sinne einer Verminderung der spezifischen Bindung. Unter Berücksichtigung oben angeführter Störfaktoren können mit Radiorezeptorassays nützliche Studien über zirkulierende Hormone durchgeführt werden, die das aktive Hormon messen, besonders wenn sie mit einem spezifischen Radioimmunoassay kombiniert werden. Die Möglichkeit der Interferenz von Substanzen, die zusätzlich in der hormonhaltigen Probe vorhanden sein können, muß allerdings genauestens untersucht werden, bevor die Verdrängung tatsächlich als "Hormon"-Verdrängung dargestellt wird. Eine große Möglichkeit ist die Charakterisierung von tierischem Hormon bei tierexperimentellen Studien ohne den Aufbau eines spezifischen Radioimmunoassays mit einem Radiorezeptorassay z.B. bei Choriomammotropin (51,90,67)

1.6. Ziel der Arbeit war Plasmamembranen aus Lebergewebe möglichst rein zu präparieren, mit Überprüfung der Reinheit anhand von Enzymtesten und Elektronenmikroskopie.

Mithilfe dieser Leberplasmamembranen sollte ein spezifischer Radiorezeptorassay für humanes Prolaktin erstellt werden.

2. Methoden

2.1. Präparation von Leberzell-Plasmamembranen

2.1.1. Präparation nach Tsushima, Friesen, Posner (102)

2.1.1.1. Zentrifugation

Reagenzien und Materialien:

1. Isotone Kochsalzlösung 9 g NaCl/ H_2O; sterilisiert
   Fa. Fresenius, Bad Homburg
2. Infusionsbesteck
3. Homogenisierpuffer: Tris (hydroxy methyl) aminomethan
   ($C_4H_{11}NO_3$ 0,025 M)
   Fa. Merck, Darmstadt, Art. Nr. : 8382
   Saccharose $C_{12}H_{22}O_{11}$ 0,3 M
   Fa. Merck, Darmstadt, Art. Nr.: 7654
   Puffereinstellung auf pH 7,6 mit HCL rauchend 37%
   Fa. Merck, Darmstadt, Art. Nr.: 317
4. Puffer zur Suspendierung der Plasmamembranen:
   Tris 0,025 M (siehe 3.)
   Calciumchlorid-2-hydrat $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ 0,01 M,
   Fa. Merck, Darmstadt, Art. Nr.: 2382
   Natriumazid NaN_3 0,02 g%
   Fa. Merck, Darmstadt, Art.Nr.: 6688
   Puffereinstellung auf pH 7,5 mit HCL: siehe 3.
5. Waring commercial blendor
6. Mullkompressen
   Fa. Hartmann DAB 7, DIN 61630 BW
7. Braunhomogenisator Potter S Nr.: 853202
8. Kühlzentrifuge PR-600 C
   Damon/EC Division
   Biotronic Wis.. Geräte GmbH, Frankfurt/Main
9. Ultrazentrifuge LS-50
   Fa. Beckmann, Rotor Ti 35
   Zentrifugenröhrchen: Polyallomer

Durchführung:

Für die Präparation der Leberzell-Plasmamembranen verwendeten wir Lebergewebe schwangerer Kaninchen. 1-2 Tage vor Ende der Tragzeit wurden die Kaninchen geschlachtet, die Leber

entnommen und sofort auf Eis gelegt. Um das Blut vollständig aus der Leber zu entfernen, spülten wir mit isotoner Kochsalzlösung, dann mit Homogenisierpuffer und Saccharose mithilfe eines Infusionsbesteckes von der vena porta aus nach. Dann bestimmten wir das Feuchtgewicht der Leber. Die Leber wurde dann in 5-Gramm Stücke zerschnitten und mit Homogenisierpuffer auf das 5-fache Gewichts-Volumen aufgefüllt.

Die Leberstücke mit dem aufgefüllten Homogenisierpuffer wurden in einem Waring-commercial-blender 10 sec lang bei "low speed" gemischt, durch 4 Lagen Gaze filtriert und danach in einem Braunhomogenizer mit 8 Strich homogenisiert. Das gewonnene Homogenat wurde nun in der Kühlzentrifuge PR-600 C zentrifugiert (600g/15min/4°C). Der Überstand 1 wurde dann in einer Ultrazentrifuge (Beckmann,Rotor Ti35) zentrifugiert (15000g/30min/4°C). Den so gewonnenen Überstand 2 zentrifugierten wir wiederum in der Ultrazentrifuge (100000g/90 min/4°C). Den Rückstand dieser Zentrifugation lösten wir in Tris-$CaCl_2$-NaN_3-Puffer.

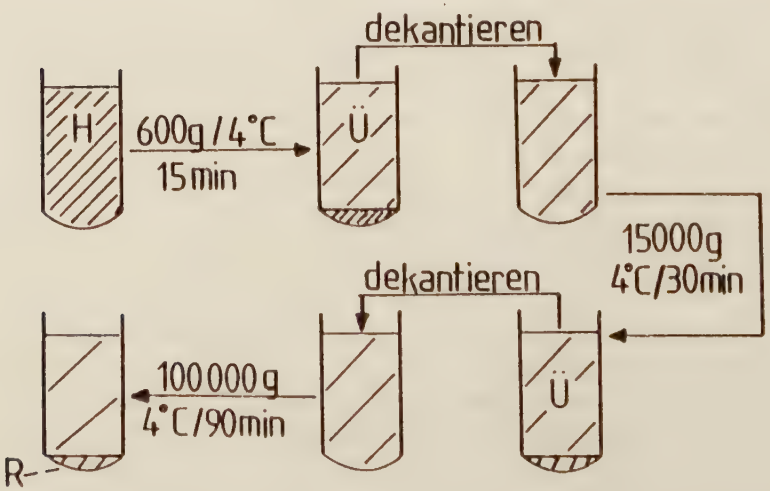

Abb. 1: Zentrifugationsschritte zur Präparation von Leberplasmamembranen,modifiziert nach Tsushima,Friesen, Posner (102)
H=Homogenat, Ü=Überstand, R=Rückstand (Leberplasmamembranen)

2.1.1.2. Enzymtests

Da sich bestimmte zellständige Enzyme jeweils verschiedenen Zellorganellen zuordnen lassen, konnten wir anhand spezifischer Enzymmarker diese Zellorganellen in den Homogenaten nachweisen. Ziel unserer Arbeit war die größtmögliche Anreicherung und Reinigung von Plasmamembranen. Zu deren Nachweis diente uns die 5'-Nukleotidase. Um Verunreinigungen durch Mitochondrien festzustellen, bestimmten wir die Aktivität der Citratsyntase. Eventuelle Bestandteile des endoplasmatischen Retikulums sollten anhand der Aktivität der NADPH-Cytochrom-C-Reduktase nachgewiesen werden. Mithilfe des Glucose-6-P-Tests kann ebenfalls die Aktivität des endoplasmatischen Retikulums gemessen werden, wobei er der NADPH-Cytochrom-C-Reduktase-Aktivität an Spezifität unterlegen ist. Es wurden jeweils die spezifischen Aktivitäten errechnet, d. h., die Enzymaktivität bezogen auf den in der Probe enthaltenen Proteingehalt.

2.1.1.2.1. 5'-Nukleotidase-Test nach Nathan u. Aronson(28)

Die 5'-Nukleotidase (5'-Ribonukleotid-Phosphohydroxylase)[E. C.3.1.3.5] katalysiert die Dephosphorylierung von Nukleosidphosphaten, deren Phosphat an das C_5-Atom des Riboserings gebunden ist. Die Enzymaktivität wird durch das pro Zeiteinheit entstandene Phosphat aus einer vorgegebenen Menge von 5'-AMP als Substrat bestimmt. Anorganisches Phosphat reagiert mit Natriummolybdat zu Phosphormolybdat. Durch Reduktion mit p-Methylaminophenolsulfat wird das Phosphormolybdat in kolloidales Molybdänblau übergeführt, welches photometrisch bestimmt werden kann. Das gebildete Molybdänblau ist proportional der Menge des vorhandenen anorganischen Phosphats. Das im Assay enthaltene Magnesiumchlorid dient zur Aktivierung des Enzyms.

Reagenzien und Geräte:

1. Adenosin-5'-Monophosphat, kristallin, Di-Natriumsalz
   50mM, pH 7
   Fa. Boehringer, Mannheim; Art.Nr.: 1021992

2. Glycin-NaOH-Puffer 0,5 M pH 9,1
   Fa. Merck,Darmstadt; Art.Nr. 9141
3. $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 0,1 M
   Fa. Merck,Darmstadt; Art.Nr.: 5833
4. Trichloressigsäure CCl_3COOH 20%
   Fa. Merck,Darmstadt;Art.Nr.: 807
5. Merckotest für anorganisches Phosphat:
   Fa. Merck,Darmstadt, Art.Nr.: 3331
   a) Bisulfit-Borat-Lösung 52mM/l $Na_2B_4O_7$ mM
      190mM/l $NaHSO_4$ mM
   b) Molybdatlösung: 2,6 N Schwefelsäure, 100mM/l Na_2MoO_4
   c) Reduktionslösung:
      29mM/l p-Methylaminophenolsulfat
      320mM/l $NaHSO_3$
   d) Sulfit-Carbonatlösung
      55mM/l Na_2SO_3
      400mM/l Na_2CO_3
   e) Phosphatstandardlösung (5mg Phosphat/100ml)
6. Eppendorf-Photometer,
   Fa. Metheler & Hinz GmbH,Hamburg;
7. Schüttelbad (Inkubator)

Durchführung:
Ein Volumenanteil der Lösung 1,
Zwei Volumenanteile der Lösung 2,
Ein Volumenanteil der Lösung 3 und
Fünf Volumenanteile Aqua bidest.
ergeben die Reaktionslösung.

500 µl Mikrosomensuspension und 450 µl dieser Reaktionslösung werden in ein Reagenzglas pipettiert und bei 37°C im Schüttelbad 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wird die Reaktion mit 500 µl 20%iger Trichloressigsäure gestoppt. Es folgt eine Zentrifugation bei 1500 g und 4°C 20 min lang in der PR-600 C Kühlzentrifuge (siehe 2.1.1.1.). Jetzt pipettiert man jeweils 0,2 ml des Überstands, 1ml der Bisulfit-Borat-Lösung (siehe 5.a), 0,2 ml Molybdat-Lösung (siehe 5.b) und 0,2 ml der Reduktionslösung (siehe 5.c) in ein Reagenzglas und mischt den Inhalt gründlich durch. Die Reagenzglä-

ser werden verschlossen und 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach werden 2 ml Sulfit-Carbonat-Lösung zugegeben (siehe 5.d), gemischt und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Es folgt die Messung der Extinktion in einem Eppendorf-Photometer bei Hg 578 nm.

2.1.1.2.2. Spezifischer 5'-Nukleotidase-Test (nach Gerlach, Hilby (28) [EC.3.1.3.5.]

Der unter 2.1.1.3.1. beschriebene 5'-Nukleotidase-Test hatte den Nachteil, daß auch unspezifische Phosphatasen erfaßt wurden. Wir verwendeten daher zusätzlich den spezifischen 5'-Nukleotidase-Test. Prinzip dieses Tests ist, daß in Gegenwart von Nickelionen die Aktivität der spezifischen 5'-Nukleotidase gehemmt wird. In Gegenwart von Nickelionen wird also die Aktivität der unspezifischen Phosphatasen ($=E_{II}$) in Abwesenheit von Nickelionen die Summe der Aktivitäten der unspezifischen Phosphatasen und der 5'-Nukleotidase gemessen ($=E_{I}$).
Die Differenz der bei beiden Reaktionen pro Zeiteinheit abgespaltenen Phosphationen dient als Maß der 5'-Nukleotidase-Aktivität. Die Differenz der Extinktionen minus der Extinktion des Phosphatleerwerts der Probe ($E_I - E_{II}$) entspricht der durch die 5'-Nukleotidase abgespalteten Menge Phosphationen.

Reagenzien:

1. Mangan-II-Sulfat-1-Hydrat $MnSO_4H_2O$ 20 mM
   Fa. Merck, Darmstadt; Ar.Nr.: 5963
   0.38 g $MnSO_4$ mit Aqua dest. ad 1000 ml lösen
2. Natrium-5,5-diäthylbarbitursäure, Veronal-Natrium
   $C_8H_{11}O_3N_2Na$, Salzsäure 2 N

Veronalpuffer 40 mM pH 7,5
8,25 g Veronal-Na in 700 ml Wasser lösen, mit 2 N HCL auf pH 7,5 einstellen, mit Wasser auf 1000 ml auffüllen.

3. Nickelchlorid, $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 0,1M
   Fa. Merck, Darmstadt; Art. Nr.: 6767
   23,77 g $Ni\ Cl_2 \cdot 6\ H_2O$ mit Wasser ad 1000 ml lösen

4. Adenosin-5'-Monophosphat (Kristallisiertes Di-Natriumsalz $C_{10}H_{12}O_7N_5PNa_2 \cdot 6H_2O$ 10mM
   Fa. Boehringer, Mannheim; Art.Nr.: 102199
   0,0499 g AMP-Na_2 in 10 ml Wasser lösen.
5. Trichloressigsäure CCl_3COOH 0,68 M
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 807
   111,11 g CCl_3COOH mit Wasser ad 1000 ml lösen.
6. Ammoniumheptamolybdat $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 40mM
   Fa. Serva, Heidelberg; Art.Nr.: 13370

   Schwefelsäure 96%
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 731
   40,5 konz. Schwefelsäure in 109 ml Wasser einrühren (Eisbad, Schutzbrille)

   12,5 g Ammoniumheptamolybdat in 100 ml Wasser lösen und in 125 ml der verdünnten H_2SO_4 einrühren. Mit Wasser auf 250 ml auffüllen.
7. Reduktionslösung: Kaliumdisulfit $K_2S_2O_5$
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 5057
   4-Methylaminophenolsulfat $C_{14}H_{20}N_2O_6S$
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 7299

   25 g Kaliumdisulfit in 60 ml Wasser lösen.
   0,2 g 4-Methylaminophenolsulfat in 10 ml Wasser lösen.
   Beide Lösungen mischen und mit Wasser auf 100 ml auffüllen, danach Lösung filtrieren.
8. Natriumacetat $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ 2,5M
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 6267
   85 g CH_3COONa mit Wasser ad 250 ml lösen.

Das Reduktionsreagenz ist lichtempfindlich und kann nur dunkel verpackt einige Tage aufbewahrt werden. Die Nukleotidlösung kann bei -20°C längere Zeit gelagert werden. Die anderen Lösungen sind auch bei Zimmertemperatur unbegrenzt haltbar.

Durchführung:

Der Test selbst besteht aus drei Probeserien:

I) Ohne Ni-Zusatz

II) Mit Ni-Zusatz

III) Phosphatleerwert der Probe

In folgender Reihenfolge pipettiert man in die Zentrifugengläser:

	I	II	III	Konz. im Test
Veronalpuffer	1,5ml	1,3ml	1,5ml	30mM
Mangansulfatlsg.	0,1ml	0,1ml	0,1ml	1mM
Nickelchloridlsg.		0,2ml		10mM
Mikrosomenprobe	0,2ml	0,2ml	0,2ml	
Aquadest.			0,2ml	
AMP-Lösung		0,2ml	0,2ml	1mM

Den Probeninhalt mischen, 30 min im Schüttelbad bei 37°C inkubieren. Um die Enzymreaktion zu stoppen, gibt man jeweils 2ml Trichloressigsäure (20%) hinzu. Danach zentrifugiert man das Reagenzgemisch 5 min lang bei 3000g, 4°C.
Von dem so erhaltenen Überstand pipettiert man für den folgenden Arbeitsgang jeweils 2,5ml in die Reagenzgläser:

	I	II	III	Konz. im Test
Überstand	2,5ml	2,5ml	2,5ml	
Aqua dest.	7,5ml	7,5ml	7,5ml	
Molybdatlsg.	2,0ml	2,0ml	2,0ml	4mM
Reduktionslsg.	1,0ml	1,0ml	1,0ml	

Den Reagenzinhalt wieder mischen und 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen. Jetzt gibt man in jedes Reagenzglas 4ml Aqua dest., vermischt den Probeninhalt und läßt ihn 5 min bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wird die Extinktion im Eppendorf-Photometer bei 578 nm Hg bei Raumtemperatur gemessen.

Bei der Durchführung des Enzymtests wird neben der Probe auch immer eine Standard- und eine Blindprobe (Aqua dest.) gemessen bzw. mitbestimmt.

Die Berechnung der Phosphatkonzentration in der Küvette erfolgt nach der Formel:

$$\text{Phosphatkonzentration} = \frac{E_A}{E_S} \times 1{,}6 \text{ mM/l}$$

wobei E_A = Extinktion der Analyse und
E_S = Extinktion des Standards

2.1.1.2.3. Citratsynthase-Test (28)

Um Verunreinigungen durch Mitochondrien festzustellen, bestimmten wir die Aktivität der Citratsynthase. Die Citrat-Synthase katalysiert die Reaktion des in der Indikatorreaktion entstanden Oxalatacetats mit Acetyl-CoA. Im gleichen Maß wie Oxalacetat in dieser Reaktion verbraucht wird, bildet sich reduziertes APAD-H, dessen Zunahme bei 366 nm im Eppendorf-Photometer gemessen werden kann und auf die Citratsynthase-Aktivität schließen läßt.

$$\text{Malat} + \text{Acetyl-pyridinadenindinukleotid} \xrightarrow{\text{MDH}} \text{Oxalacetat} + \text{APAD-H}$$

$$\text{Acetyl-CoA} + \text{Oxalacetat} \xrightarrow{\text{Citratsynthase}} \text{Citrat} + \text{CoA}$$

Reagenzien:

1. Trap-Puffer (Triäthanolaminpuffer) 100 mM pH 7,5
   Triäthanolamin . HCL $C_6H_{15}O_3N$. HCL
   Fa. Serva, Heidelberg; Art.Nr.: 36885
2. L-Malat 140 mM
   Fa. Serva, Heidelberg; Art.Nr.:28337
3. APAD = Acetylpyridinadenindinucleotid 10 mM
   Fa. Boehringer, Mannheim; Art.Nr.: 101966
4. Malat-Dehydrogenase (1 Teil + 10 Teile Puffer)
   Fa. Boehringer, Heidelberg; Art.Nr.: 15048
5. Acetyl-CoA 8,4 mM
   Fa. Boehringer, Mannheim; Art.Nr.: 101907

Durchführung:

Folgende Reagenzien werden zusammen in eine 1 cm-Küvette pipettiert:

750 µl Trap-Puffer (siehe 1.)
20 µl L-Malat 19mg/ml (siehe 2.)
20 µl APAD 10 mM= 25mg freie Säure + 3,8 ml H_2O
100 µl Mikrosomensuspension
20 µl Malat-Dehydrogenase (siehe 4.)

Die Extinktion dieses Gemisches wird nun in einem Eppendorf-Photometer mit einem Hg 366 nm-Filter gemessen. Ein Thermostat sorgt für die konstante Reaktionstemperatur von 29°C, die dem Reaktionsoptimum entspricht. Mit dem Photome-

ter ist ein Extinktionsschreiber verbunden, der bei einem Vorschub von 1cm/min die Extinktionsänderung in Abhängigkeit von der Zeit registriert. Man macht zuerst einen Vorlauf über 5 min. zur Einstellung des Gleichgewichts zwischen Malat und Oxalacetat. Dann startet man die Reaktion durch Zugabe von 20 µl Acetyl-CoA (7 mg/ml).
Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{1000 \times \text{Testvolumen (ml)}}{E \times d \times \text{Probevolumen}} \cdot \frac{E}{t}$$

2.1.1.2.4. NADPH-Cytochrom-C-Reduktase-Test (28)

Die NADPH-Cytochrom-C-Reduktase dient als Markerenzym für das endoplasmatische Retikulum. Cytochrom-C wird durch die NADPH-Cytochrom-C-Reduktase reduziert. Das reduzierte Cytochrom-C kann im Photometer bei 546 nm-Filter gemessen werden. Um die Atmungskette in den Mitochondrien zu stoppen wird KCN zugegeben.

1. KH_2PO_4 Kaliumdehydrogenphosphat
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 4873
2. $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ Di-Na-hydrogenphosphat-2-hydrat
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 6580
3. Cytochrom C (Pferdeherz) kristallisiert
   Fa. Boehringer, Mannheim; Art. Nr.: 15143
4. Kaliumcyanid 100 mM (in Puffer)
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 4967
5. Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat reduziert NADPH 30 mM (in Puffer)
   Fa. Boehringer, Mannheim; Art.Nr.: 15501
6. pH-Meter
   Fa. WTW, Weilheim;
7. 0,5 M Phosphatpuffer-Stammlösung nach Sörensen:
   mithilfe des pH-Meters gibt man zu $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ (89 g auf 1000 ml H_2O) solange eine Lösung von KH_2PO_4 (6,82 g auf 100 ml H_2O) hinzu, bis ein pH von 7,6 erreicht ist.

Anschließend wird 1:10 verdünnt, um eine 50 mM-Konzentration zu erhalten.

Testansatz:

Man pipettiert 10 ml PO_4-Puffer 50 mM pH 7,6 in ein lichtdichtes Gefäß, das in Eiswasser gekühlt wird, löst darin 26 mg Cytochrom C, und gibt 100 µl KCN 100 mM hinzu. Das Gemisch ist max. 1 Stunde haltbar.

Durchführung:

In eine 1 cm-Küvette werden 750 µl des Testansatzes pipettiert, zuzüglich 100µl Mikrosomen. Die Extinktion dieses Gemisches wird in einem Eppendorf-Photometer mit einem HG 546 nm-Filter gemessen. Ein Thermostat sorgt für eine konstante Reaktionstemperatur von 29°C, was dem Reaktionsoptimum entspricht. Ein mit dem Photometer verbundener Extinktionsschreiber mit einem Vorschub von 1cm/min registriert die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit. Ist nach einem kurzen Vorlauf das Gleichgewicht erreicht, dann wird durch Zugabe von 10 µl NADPH (30 mM) die Reaktion gestartet. Die Berechnung der Aktivität erfolgt nach der in 2.1.1.3.3. angegebenen Formel.

2.1.1.2.5. Glucose-6-Phosphatase-Test (28) [EC 1.1.1.4.9.]

Die Glucose-6-Phosphatase sitzt bevorzugt am endoplasmatischen Retikulum und katalysiert folgende Reaktion:

$$\text{Glucose-6-Phosphat} + H_2O \xrightarrow{\text{Gluc-6-P-ase}} \text{Glucose} + PO_4$$

Reagenzien:

1. Natrium-Glucose-6-Phosphat 0,1 M pH 6,5
   Fa. Boehringer, Mannheim; Art.Nr.: 105333
2. Histidine 35 mM pH 6,5
   Fa. Serva, Heidelberg; Art.Nr. 11280
3. Natrium-EDTA 10 mM pH 7,0
   Fa. Serva, Heidelberg; Art.Nr. 11280
4. Trichloressigsäure 20%
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr. 807
5. Merckotest für anorganisches Phosphat (siehe 2.1.1.3.1.)

Testansatz:

2 Volumenanteile Natrium-Glucose-6-Phosphat +
1 Volumenanteil Histidine +
1 Volumenanteil Natrium EDTA +
1 Volumenanteil Aqua dest.

Durchführung:

0,5 ml Probe werden mit 0,5 ml Testmix 30 min lang bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Die Reaktion wird mit 0,5 ml 20%iger Trichloressigsäure gestoppt und anschließend in der Zentrifuge PR 600 C bei 15000 g 30 min lang bei 4°C zentrifugiert. Dann erfolgt die Bestimmung des freigewordenen Phosphats im Überstand mithilfe des Merckotests für anorganisches Phosphat (siehe 2.1.1.3.1.)

2.1.1.2.6. Proteinbestimmung nach Lowry (71)

Die spezifische Enzymaktivität der einzelnen Präparationen sollte verglichen werden. Unter spzifischer Enzymaktivität versteht man die Enzymaktivität in Einheiten, bezogen auf den Proteingehalt. Zur Messung der Proteinmengen verwendeten wir die Methode nach Lowry.

Reagenzien:

1. Natriumbicarbonat Na_2CO_3 2g%
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 6392 gelöst in
2. Natronlauge 0,1 M
   Fa. Merck, Darmstadt;, Art. Nr.: 9137
3. Kupfersulfat $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ 0,5 g%
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 2790
4. Kalium-Natrium-Tartrat $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4 H_2O$ 1,5 M
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 8087
5. Dodecylsulphat-Na-Salz (SDS 10% $C_{12}H_{25}OSO_3 \cdot Na$
   Fa. Serva, Heidelberg; Art. Nr. 20760
6. Folin-Ciocaltens Phenolreagenz (1 Vol.-Teil + 1 Vol.-Teil H_2O, Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 9001
7. Humanserumalbumin
   Fa. Behring, Marburg/Lahn; Art.Nr.: Ø RHA 04

Die Na_2CO_3 Lösung muß jeweils frisch zubereitet werden, $CuSO_4$ und K-Na-Tartrat muß getrennt aufbewahrt werden. SDS ist längere Zeit haltbar.

Testmix:

Man gibt:

49 ml Na_2CO_3-Lösung zu
0,5 ml $CuSO_4$ + 0,5 ml K-Na-Tartrat (vor Zugabe vermischen)
+ 2,5 ml SDS

zusammen in ein Reagenzglas und mischt mit einem Magnetrührer durch.

Durchführung:

Es werden 1 ml des Testmix und 50 µl der zu messenden Probe in ein Reagenzglas pipettiert. Nach dem Mischen wird 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Unter Schütteln wird dann 0,1 ml Folinreagenz zugegeben und 30 min. lang bei Raumtemperatur inkubiert.
Um genaue Ergebnisse zu erhalten ist es wichtig, die Zeiten exakt einzuhalten. Es wird die Extinktion bei Hg 578 nm im Eppendorf-Photometer gemessen. Zu jedem Ansatz muß gleichzeitig eine Albumin-Standardkurve angefertigt werden. Die Humanserumalbumin-Standardkurve umfaßt den Bereich von 12,5 µg/µl bis 100µg/µl. Zusätzlich zu den Proben und den Albuminextinktionen werden jeweils Blindwerte (mit Aqua dest.) gemessen. Anhand der Humanserumalbumin-Standardwerte kann dann dem gemessenen Extinktionswert der Probe die jeweilige Proteinkonzentration zugeordnet werden.

2.1.2. Präparation nach Ray modifiziert (91)

2.1.2.1. Zentrifugation

Reagenzien und Materialien:

1. Isotone Kochsalzlösung 9 g NaCl/1 H_2O, sterilisiert
   Fa. Fresenius, Bad Homburg;
2. Infusionsbesteck
3. Homogenisierpuffer:
   HEPES (N-2-Hydroxylpeperacin-2-Äthansulfonsäure) 10 mM
   Fa. Serva, Heidelberg; Art. Nr.: 25245

4. Natriumacid NaN_3 0,02g%
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 6688
5. Saccharose $C_{12}H_{22}O_{11}$ 0,25 M
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 7654
6. Waring commercial blender
7. Mullkompressen
   Fa. Hartmann, DAB 7, DIN 61630 BW
8. Braunhomogenisator Potter S, Art.Nr.: 853203
9. Kühlzentrifuge PR 600 C
   Damon-EC Division
   Viotronic Wiss. Geräte GmbH, Frankfurt/Main
10. Ultrazentrifuge LS 50
    Fa. Beckmann, Rotor Ti 35
    Zentrifugenröhrchen: Polyallomer
11. Puffer zur Suspendierung der Plasmamembranen,
    HEPES (siehe 3.)
    Saccharose (siehe 5.) (Puffereinstellung auf ph 7,5)
12. Magnesiumchlorid 1 mM
    Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 2300
    Natriumacid (siehe 4.)

Durchführung:

1. Kaninchenleber

Ein trächtiges Kaninchen wird am 20.- 30. Schwangerschaftstag geschlachtet. Man entnimmt die Leber und befreit sie vom Bindegewebe. Von den Lebervenen aus wird zuerst mit 0,9% NaCl, dann mit Homogenisierpuffer gespült bis sich die weißliche Entfärbung der Leber anzeigt. Anschließend bestimmt man das Feuchtgewicht der Leber, zerschneidet sie in 5 g Stücke und füllt mit Homogenisierpuffer auf das 5-fache Gewichtsvolumen auf. Im Waring-commercial blender wird die Leber mit dem Homogenisierpuffer bei 'low speed' 10 sec lang gemixt. Dann wird das Gemisch im Braun Homogenizer (Teflon 1000 rpm/4°C) zuerst mit einer Clearance von 66 µm, dann mit 33 µm Clearance 3Striche zu je 5 sec gepottert. Anschließend wird die Suspension durch eine 4-fache Gaze gefiltert und dann mit Homogenisierpuffer auf das 10-fache Leberfeuchtgewicht aufgefüllt. Man zentrifu-

giert nun in der IEC PR 600 C bei 1800 rpm/4°C, 3 x 15 min, wobei wir 500 ml-Plastikgefäße benutzten. Der jeweilige Überstand wird abgesaugt und das Pellet mit dem halben Volumen des vorherigen Überstands und mit Homogenisierpuffer gelöst. Das Pellet der dritten Zentrifugation wird mit Puffer (Nr. 11) auf das 2-fache des Leberfeuchtgewichts aufgefüllt, gelöst und in 20 ml-Fraktionen eingefroren.

2. Rattenleber

Reagenzien siehe Kaninchenleber

Die Ratten werden am 14.-16. Schwangerschaftstag geschlachtet, die Leber entnommen und von Bindegewebe befreit. Von den Lebervenen aus wird mit 0,9% NaCl (4°C), dann mit Homogenisierpuffer gespült, bis sich die Leber weißlich entfärbt. Nachdem das Leberfeuchtgewicht bestimmt wurde, zerschneidet man sie in 5 g Stücke und füllt mit Homogenisierpuffer auf das 5-fache Gewi chtsvolumen auf.

Die Leber wird nun mit Homogenisierpuffer in Waring commercial blender bei low speed, 10 sec gemischt. Die Suspension wird im Braun Homogenizer (Teflon 1000 rpm, 4° C) zuerst mit einer Clearence von 66 µm, dann mit 32 µm gepottert. Anschließend filtert man die Suspension durch 4-fache Gaze und füllt dann auf das 10-fache des Leberfeuchtgewichtes auf. Nun zentrifugiert man 3 mal je 15 min (4°C, 1800 rpm in der IEC PR 600 C), saugt jeweils den Überstand ab und löst das Pellet mit ca. der Hälfte des Überstands plus ca. der gleichen Menge Homogenisierpuffer. Das Pellet der dritten Zentrifugation wird in 4-fachen Volumen des Leberfeuchtgewichts gelöst und in 20 ml Fraktionen bei -20°C eingefroren.

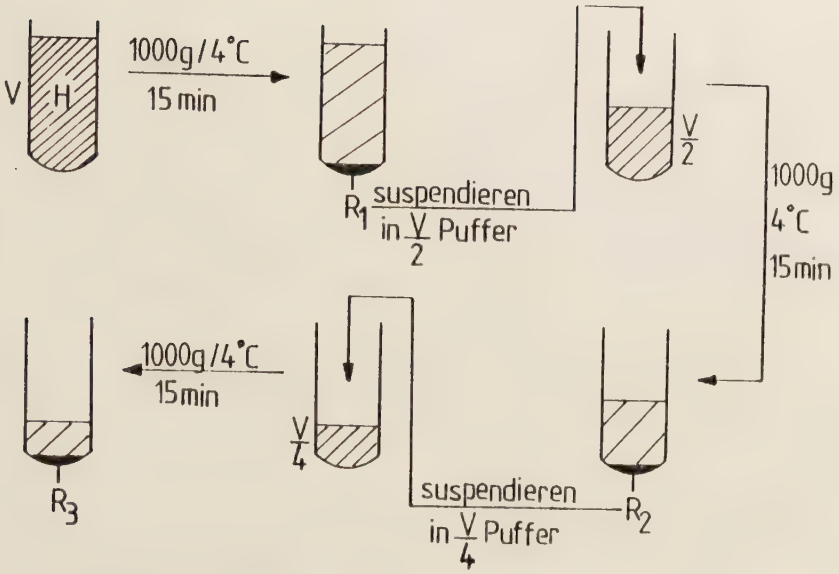

Abb. 2: Zentrifugationsschritte zur Präparation von Leberplasmamenbranen modifiziert nach Ray (78) H=Homogenat, V=Volumen, R=Rückstand

2.1.2.2. Saccharosegradient

Zur Gewinnung der subzellulären Fraktion arbeiteten wir nach der Präparationsmethode nach Ray modif.. Unter der Annahme, daß sich verschiedene Zellorganellen bei verschiedenen Mediumskonzentrationen anreichern, mußte geklärt werden, welches Zellorganell sich an der jeweiligen Konzentration anreichert. Als Medium benutzten wir Saccharose.

2.1.2.2.1. Refraktometer

Reagenzien:

1. Saccharoselösungen
5% (5g + 95 ml Aqua dest.)
10% (10g + 90 ml ")
20% (20g + 80 ml ")
30% (30g + 70 ml ")
. . .
. . .
70% (70g + 30 ml ")

2. Abbe-Refraktometer, Modell A
   Fa. Kikuchi; Best. Nr.: 0201

Vorneweg wurden die jeweiligen Zuckerlösungen hergestellt und der Brechungsindex der jew. Saccharoselösung im Abbe-Refraktometer bestimmt. Jetzt wurde der Brechungsindex der Mikrosomenlösungen mit zusätzlicher Verdünnungsreihe ohne Saccharose bestimmt. Zuletzt wurde der Brechungsindex für folgende Mikrosomenverdünnungen (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) gemischt mit jeweils 70%iger Saccharoselösung bestimmt.

2.1.2.2.2. Kontinuierlicher Saccharosegradient

Reagenzien und Geräte:

1. Saccharose $C_{12}H_{22}O_{11}$
   Fa. Merck, Darmstadt; Art. Nr.: 7654
2. Nilblausulfat reinst $(C_{20}H_{20}N_3O)_2SO_4$
   Fa. Serva, Heidelberg; Art. Nr.: 30405
3. Multi-Channel Gradientformer
   Fa. Cenco Deutschland GmbH, Art.Nr.: 34540
4. Magnetrührer
5. Eppendorf Photometer, Filter 578 nm
6. UV-Photometer
   Fa. Zeiss
7. SDS 10%ig (siehe 2.1.1.3.6.)
8. Beckmann Ultrazentrifuge LS 50
   SW 27 Schwenkrotor
9. Abbe-Refraktometer
   Fa. Kikuchi, Modell A, Best.Nr. 0201
10. Fraktionssammler mit Zählrohr

Durchführung:

Überprüfung der Linearität des Saccharosegradienten mit dem Refraktometer und der Nilblausulfatverdünnungsmessung. In das Mischgefäß füllt man 150 ml der 37%igen Saccharoselösung (w/w), in das Vorratsgefäß die gleiche Menge der gewünschten niedrigsten Konzentration (hier: Aqua dest.). Das Vorratsgefäß ist mit dem Mischgefäß über 3 Teflonschläuche verbunden. Vom Mischgefäß zu den

Reagenzgläsern führen 6 Schläuche. An den Enden dieser Schläuche befinden sich Nadeln, die in einem horizontalen Träger befestigt sind. Der Träger ist in der Höhe verstellbar. Um eine kontinuierliche Schichtung zu garantieren, dürfen die Nadeln jeweils nur minimal in die Lösung eintauchen. Dies erreicht man, indem man die Nadeln entsprechend dem Füllstand mitbewegt. Bei vollständiger Entleerung des Misch- und Vorratsgefäßes entsteht in den Zentrifugenröhrchen ein von unten nach oben abnehmender Konzentrationsgradient, beginnend mit der Konzentration im Mischgefäß, endend mit der Konzentration im Vorratsgefäß. Durch Zugabe von 2,5 mg/200 ml Nilblausulfat konnte die Linearität des Konzentrationsgradienten im Eppendorf-Photometer geprüft werden. Zusätzlich kontrollierten wir die Linearität im Abbe-Refraktometer.

Dabei galt es, den Gradienten für den Meßvorgang fraktionsweise aus den Zentrifugenröhrchen zu erhalten, ohne ihn dabei zu vermischen.

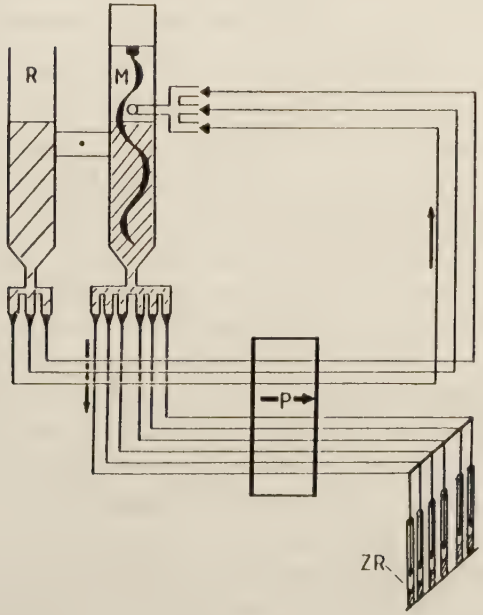

Abb. 3: Schematische Darstellung eines Gradientenformer zur Bildung von kontinuierlichen u. diskontinuierlichen Gradienten.

R=Reservoir Zylinder

M=Mischgefäß Zylinder

P=Pumpe

ZR=Zentifugenröhrchen

Das Zentrifugenröhrchen wurde mit einem Mandrin vorsichtig angestochen, der Mandrin entfernt und die Kanüle mit einem Plastikschlauch verbunden, der über eine Pumpe zum Fraktionssammler geleitet wurde. Der im Zentrifugenröhrchen vorhandene Konzentrationsgradient wurde so im Fraktionssammler, der mit einem Zählrohr verbunden ist, in 1ml-Fraktionen aufgeteilt (1ml=13 Tropfen). Der Konzentrationsgradient wurde dadurch auf 40 Ein-Milliliterfraktionen aufgeteilt. Die Saccharosekonzentration wurde nun im Abbe-Refraktometer anhand der Brechzahl, im Eppendorf-Photometer mithilfe der Nilblauverdünnung gemessen.

Derselbe Arbeitsvorgang wurde auch nach der Zentrifugation des linearen Saccharosegradienten wiederholt, um eine evtl. Vermischung des Gradienten durch das Zentrifugieren zu überprüfen. Die Zentrifugation wurde in einer Beckmann Ultrazentrifuge (22500rpm=65000g/120min/4°C) im SW-27 Rotor ausgeführt.

Nach Überprüfung der Linearität der Saccharosekonzentrat. wurde nun die Auftrennung der Mikrosomenanteile auf verschiedene Saccharosedichten untersucht. Dafür wurde der Proteinanteil der einzelnen Fraktionen mit SDS in Lösung gebracht und die Extinktion im UV-Photometer gemessen.

2.1.2.2.2.1. Kontin. Saccharose-Gradient von R_3, Schicht I u. II

Wir verwendeten den Rückstand R_3, der mit dem Dounce-Homogenizer homogenisiert und dann mit einer 70 %igen Saccharoselösung (w/w) auf 48 % eingestellt wurde. Man pipettiert nun in jedes Zentrifugenröhrchen 5 ml der 48 %igen Mikrosomen-Saccharoselösung und schichtet darüber einen linearen Gradienten von 46 %iger bis 20 %iger Saccharoselösung. Die Zentrifugenröhrchen werden vorsichtig in den SW 27 Schwenkrotor der Beckmann Ultrazentrifuge gestellt und bei 22500 rpm/120 min/4°C ohne Bremse zentrifugiert. Die Aufteilung des linearen Gradienten auf 1 ml Fraktionen wurde wieder wie oben beschrieben durchgeführt. Anschließend gaben wir zu den einzelnen 1 ml Fraktionen 0,5 ml 10 %iges SDS, was die über den ganzen Gradienten verteilten Proteine in Lösung brachte. Dann wurde der Proteinanteil der einzelnen Fraktionen im UV-Photometer bei 280 nm Wellen-

länge gemessen. Von den restlichen 5 Zentrifugenröhrchen dieses Arbeitsganges wird nun die deutlich sichtbare Bande um 36 % Dichte, die sich auf halber Höhe des Zentrifugenröhrchens befand, vorsichtig mit einer Pasteur Pipette abgesaugt und gesammelt. Diese Proteinanteile wurden nun mit 70 %iger Saccharoselösung auf 50 % eingestellt. Davon pipettiert man jeweils wieder 5 ml in 6 Zentrifugenröhrchen und schichtet nun einen kontinuierlichen Gradienten von 48-31 %iger Saccharoselösung darüber. Anschließend zentrifugiert man wieder in der Beckmann Ultrazentrifuge im SW 27 Schwenkrotor bei 22500 rpm/120 min/4°C. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient wieder wie oben beschrieben in einzelne 1 ml Fraktionen aufgeteilt. Wieder geben wir zu den einzelnen Fraktionen 0,5 ml 10 %iges SDS zur Lösung der Proteinanteile. Die Messung des Proteinanteils erfolgte wieder im UV-Photometer bei 280 nm Wellenlänge.

2.1.2.2.3. Diskontinuierlicher Saccharosegradient

Reagenzien und Geräte:

1. Saccharose $C_{12}H_{22}O_{11}$
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 7654
2. Multi Channel Gradient Former
   Fa. Cenco, Deutschland GmbH, Art.Nr.: 34540
3. Beckmann Ultrazentrifuge, SW 27 Schwenkrotor, Ti 35
4. Dounce Homogenizer
   Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen
5. Abbe-Refraktometer
   Fa. Kikuchi, Modell A, Best.Nr.: 0201
6. Dodecylsulphat-Na Salz (SDS) 10 %
   Fa. Serva, Heidelberg; Art. Nr. 20760
7. Tris-Puffer (siehe 2.1.1.Nr. 3)
8. UV-Photomer
   Fa. Zeiss, Oberkochen, Best. Nr. 503060
9. Homogenisierpuffer HEPES (siehe 2.1.2.1 Nr. 3)

Durchführung:

Nachdem die Proteinverteilung anhand des kontinuierlichen Saccharosegradienten auf die verschiedenen Saccharosekonzentrationen bekannt war, arbeiteten wir mit dem diskontinuierlichen Gradienten weiter. Dazu wurden vorneweg die Saccharoselösungen (w/w) hergestellt. Aus dem linearen Gradienten wurden die folgenden Konzentrationen abgeleitet:
Der Rückstand R_3 wurde auf 48 % eingestellt. Davon gab man in jedes Zentrifugenröhrchen 5 ml. Mithilfe des Cenco-Gradienten formers wurden je 11 ml einer 45 %igen, dann 41 %igen und dann einer 37 %igen Saccharoselösung darüber geschichtet, wobei dafür die 6-fache Menge der jeweils gewünschten Saccharoselösung in das Mischgefäß gefüllt wurde. Zur Herstellung des diskontinuierlichen Saccharosegradienten wurde also das Vorratsgefäß nicht gebraucht. Der Rückstand wurde im Dounce-Homogenizer mit 3 Strichen gleichmäßig verteilt und mithilfe einer 70 %igen Saccharoselösung auf 48 % eingestellt.
Um auch hier eine Vermischung der Schichten zu vermeiden, stellte man nach jeder Schicht die Höhe der Einfüllnadel neu ein. Während des gesamten Arbeitsvorgangs mußten die Zentrifugenröhrchen, d.h. die 5 ml Mikrosomensuspensionen gekühlt werden, wozu wir entweder die Zentrifugenröhrchen in Eisbeutel steckten oder den ganzen Arbeitsvorgang im Kühlraum durchführten. Der diskontinuierliche Gradient wird nun in der Beckmann Ultrazentrifuge im SW 27-Schwenkrotor bei 22500 rpm/4°C/120 min lang ohne Bremse zentrifugiert. Nimmt man nach der Zentrifugation die Röhrchen vorsichtig heraus, so findet man jeweils an der Grenzschicht, d.h. ganz unten am Zentrifugenglas, nach der 48 %igen, 45 %igen, 41 %igen, und 37 %igen Saccharoselösung die verschiedenen Anteile der Mikrosomen. Alle diese Schichten wurden mit der Pasteur-Pipette (für jede Schicht eine neue Pipette!) getrennt abgesaugt, gesammelt und dann mit Puffer verdünnt (Homogenisierpuffer). Die Verdünnung wurde vorgenommen, um bei der anschließenden Zentrifugation in der Beckmann Zentrifuge 22500 rpm/45 min/ 4°C mit Bremse im

Ti 35 Rotor eine bessere Auftrennung der Saccharoseanteile von den Mikrosomenfraktionen zu erreichen. Anschließend wird das Pellet (= die am Boden niedergeschlagene Mikrosomenfraktion) in Trispuffer 0,025 M gelöst. Die so in Lösung gebrachten Mikrosomenfraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

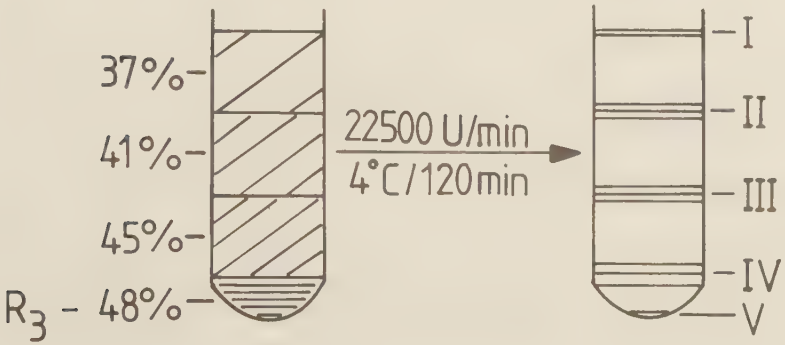

Abb. 4 : Diskontinuierlicher Saccharosedichtegradient zur Auftrennung des Rückstandes R_3

Abb. 5:
Zentrifugenröhrchen nach der Zentrifugation

Um evtl. Verunreinigungen bzw. Beimischungen in der Schicht 1 und 2 feststellen zu können, wurden Schicht 1 und 2 getrennt abgesaugt und gesammelt. Schicht 2 wurde nun auf die Dichte von 45% mit 70%iger Saccharoselösung eingestellt. 6ml dieser Suspension wurden wieder in die einzelnen Zentifugenröhrchen pipettiert und ein kontinuierlicher Gradient von 40-35%iger Saccharoselösung -nach demselben Verfahren wie oben beschrieben- darüber geschichtet und anschließend in der Beckmann Ultrazentrifuge, SW 27-Rotor bei 22500rpm, 4°C, 120 min lang ohne Bremse zentrifugiert. Für die Messung im UV-Photometer bei 280nm Wellenlänge wurden die einzelnen Fraktionen nach oben beschriebenem Verfahren aus dem kontinuierlichen Gradienten isoliert. Die einzelnen Proteinanteile mußten dafür wieder mit 0,5ml 10%igem SDS in Lösung gebracht werden.

Ebenso wurde Schicht 1 abgesaugt, gesammelt und auf 40% eingestellt. Darüber schichteten wir einen kontinuierlichen Gradienten von 39-28%iger Saccharoselösung (linear). Dann wurde ebenso wie vorhin mit der Schicht 2 verfahren.

2.2. Präparation des J^{125}Prolaktin-Tracers

Die Wirkung eines Hormons am Zielorgan geschieht durch Anlagerung des Hormons an spezifische Strukturen des Zielorganes, den Rezeptoren. Die Rezeptoren der Peptidhormone sitzen an der Zellmembran, während die Rezeptoren der Steroidhormone sich im Zytoplasma bzw. im Kern der Zelle befinden. Prolaktin ist ein Peptidhormon, dessen spezifische Rezeptoren vor allem an den Zellmembranen der Mamma und Leber sitzen. Nach oben beschriebener Methode versuchten wir Leberzellmembranen zu gewinnen und damit Rezeptoren. Zum Aufbau eines Radiorezeptorassays und damit der Bestimmung der Hormonkonzentration im Blutserum bedarf es der Rezeptoren an den Membranen und des radioaktiv markierten Hormons (^{125}J-Prolaktin).

Wir führten nun die Markierung auf zwei verschiedene Arten durch (2.2.1. und 2.2.2.)

Membransuspension und radioaktiv markiertes Prolaktin gehen eine lockere Bindung ein. Wird dazu unmarkiertes Hormon, z.B. Serum, gegeben, so wird das markierte ^{125}J Prolaktin kompetitiv aus der Rezeptorbindung verdrängt. Nach Inkubation werden die Membranen abzentrifugiert und die verbliebene Radioaktivität des Pellets gemessen. Anhand einer vorher erstellten Eichkurve (Standardkurve) unter Verwendung von Prolaktinlösungen bekannter Konzentrationen, kann auf die Prolaktinkonzentration des Serums rückgeschlossen werden.

2.2.1. Präparation des ^{125}J Prolaktin Tracers mit Chloramin T nach Greenwood und Hunter (37,42)

2.2.1.1. Isotopen

Es wird für die radioaktive Markierung von Prolaktin das Isotop ^{125}J wegen seiner längeren Halbwertszeit gegenüber dem Isotop ^{131}J bevorzugt. ^{125}J, ein Beta-Strahler, besitzt bei einer spezifischen Aktivität des trägerfreien Isotops von 8 - 15 Ci ^{125}J/mg J eine Halbwertszeit von 60 Tagen. Bei der Markierung wird das zu elementarem Jod oxydierte Jodid eingebaut. Bei der Methode nach Greenwood dientChloramin T als Oxydationsmittel, während durch Natriumbisulfit, das den Rest des freien Jods wieder zu Jodid reduziert, die Reaktion gestoppt wird. Durch das danach zugegebene Kaliumjodid als Trägerjodid, soll eine unspezifische Adsorption verhindert werden.

Reagenzien und Materialien:

1. hPRL-Standard (VLS-Prolaktin)
   hPRL-Standard wird mit 0,05 M PO_4-Puffer zu 1 µg pro 10 µl verdünnt und in 30 µl Fraktionen eingefroren.
2. ^{125}J-Natriumjodid zur Eiweißmarkierung ohne Reduktionsmittel, spezifische Aktivität 8-15 Ci ^{125}J/mg J, Gesamtaktivität 2 µCi
   Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt; Art. Nr. 5006
3. 5,5-Diäthylbarbitursäurenatriumsalz zur Analyse
   Barbitalnatrium
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 6318
   Na-Veronalpuffer 0,1 M pH 8,6:

20,6 g Barbital-Na auf 1000 ml Aqua bidest,
Einstellung auf pH 8,6 mit HCl 5 N
Na-Veronalpuffer 0,07 M:
7 Volumina 0,1 M Na-Veronalpuffer auf 3 Volumina H_2O

4. Serumalbumin vom Rind, trocken, reinst, elektrophoretischer Reinheitsgrad 100 %
Behringwerke AG, Marburg/Lahn; Art.Nr.
5 %-Rinderalbumin-Veronalpuffergemisch zur Sättigung der Sephadex-Säule,
250 mg Rinderalbumin auf 5 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer
20 %-Rinderalbumin-Veronalpuffergemisch zur Vorgabe in die Sammelröhrchen des Fraktionssammlers.

5. Chloramin T
Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 2426
50 mg Chloramin T auf 10 ml 0,05 M Phosphatpuffer
Die Lösung wird erst kurz vor Gebrauch angesetzt und in einem lichtundurchlässigen Behälter aufbewahrt.

6. Natriummetadisulfit, trocken
Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr. 6528
20 mg Natriummetadisulfit auf 10 ml 0,05 M Phosphatpuffer

7. Kaliumjodid, neutral,
Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr. 5043
50 mg KJ auf 5 ml 0,05 M Phosphatpuffer (siehe 2.1.1.3.4.)

8. Natronlauge NaOH 2N
Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr. 9136

9. Sephadex G-50 Fine
Pharmacie Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
Lot.Nr.: 127, Particle Size 20-80 µ

10. Vortex-Genie-Mixer, Petent 3061280
Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

11. Fraktionssammler

Vorbereitung der Sephadex-G 50 Säule

1. 2,5 g Sephadex G-50 Fine in 150 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer einführen und mindestens drei Stunden quellen lassen.
2. Säulenglasrohr (30 x 1 cm; mit Graduierung) reinigen, mit der Wasserstrahlpumpe trocknen und mit Äther von Fett be-

freien. Nach dem Trocknen wird der Ausfluß des Rohres mit etwas Glaswatte abgedichtet und darauf eine Schicht Glasperlen gegeben. Die Abdichtung darf nicht zu fest sein, das sonst die Durchflußgeschwindigkeit der Säule zu gering wird.

3. Glasrohr lotrecht befestigen, mit Na-Veronalpuffer vorspülen, gequollenes Gel eingießen und mindestens zwei Stunden sich absetzen lassen, darauf nachwaschen mit 10 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer.
4. Wenn die Oberfläche trocken ist, läßt man 2 ml der 5 % Albumin-Pufferlösung einziehen, wäscht mit 20 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer nach und beläßt etwa 2 ml Überstand. Dieses Absättigen der unspezifischen Proteinbindungsstellen des Sephadex-Gels erlaubt eine hohe Wiederfinderate des markierten Proteohormons.
5. Das Eluat wird mit einem Fraktionssammler in dreißig 1 ml Fraktionen aufgefangen. In die Eppendorf-Sammelröhrchen werden 20 µl einer 20 % Albuminlösung vorgegeben.

2.2.1.2. Jodierung

In ein konisches Glasröhrchen werden nacheinander einpipettiert:

^{125}J = 500mCi in 20 µl 0,5 M PO_4-Puffer,
(die Gesamtaktivität wird gemessen)
10 µl 0,5 M PO_4-Puffer
20 µl hPRL = 2 µg
10 µl Chloramin T
200 µl 0,05 M PO_4-Puffer plus 5 % Rinderalbumin

Das Reaktionsgemisch wird nach kurzem Schüttel mit 120 µg (in 150 µl PO_4-Puffer) $Na_2S_2O_5$ gestoppt. Durch Zugabe von 10 µg BSA (in 200µl PO_4-Puffer) wird überschüssiges $^{125}J_2$ (unspezifisch an BSA) gebunden, bevor das Reaktionsgemisch über die G 50 Säule in Protein und Salzpeak sich trennt. Durch die Elution über die Sephadex-Säule werden das markierte Prolaktin und das nicht in die Reaktion eingegangene, freie Jodid wieder getrennt. Es wird mit 0,07 M Veronalpuffer (siehe 2.2.1.2.Nr. 3) eluiert. Je 1 ml des Eluats wird in

30 Eppendorf-Plastikröhrchen aufgefangen. 20 µl einer 20 % Albuminlösung (siehe 2.2.1.2. Nr.4) wurden in Röhrchen 4-30 vorgegeben, womit dann eine endgültige Proteinkonzentration des Eluats von 0,4 % erreicht wird. Die Radioaktivität jedes Röhrchens wird mit einem digitalen Gammazähler gemessen.

Die graphische Darstellung des Eluats in einem Koordinatensystem mit Angabe der Zählrate an der Ordinate und der Fraktionen an der Abszisse zeigt 2 Peaks. Der erste Peak zwischen Fraktion 5 und 11, der sogenannte Proteinpeak, enthält das markierte Hormon. Im zweiten Peak, dem sogenannten Salzpeak (Fraktion 13-20) wird das freie, nicht gebundene Markierungsjodid und das Trägerjodid eluiert.

Ein guter Parameter für den Erfolg der Jodierung ist die spezifische Aktivität, worunter man die an das Hormon gebundene Radioaktivität in Ci pro g Hormonprotein versteht. Zieht man von der Gesamtaktivität des zugegebenen ^{125}J die Radioaktivität an Pipette und Reaktionsgefäß ab, so erhält man die Aktivität, die auf die Säule übertragen wurde. Addiert man die Zählraten aller Proben, so kommt man zur Aktivität des Gesamteluats. Diese sollte bei optimaler Vorbereitung der Säule annähernd dem "Säulenload" gleich sein. Der Anteil des Proteinpeaks an der Gesamtaktivität gibt an, mit wieviel Aktivität das zugegebene Prolaktin markiert wurde. Durch Einsetzen der absoluten Werte erhält man somit die spezifische Aktivität.

Da der Versuch, den Proteinpeak aus der ersten G-50 Chromatographie direkt als Tracer einzusetzen, unempfindliche Eichkurven ergeben hat, haben wir den hPRL-Tracer über G-75 rechromatographiert.

2.2.2. Präparation des ^{125}J-hPRL Tracers mit Laktoperoxidase nach Thorell, Johansson (101)

Reagenzien und Materialien

1. Puffer zum Verdünnen des ^{125}J:
   0,5 M Phosphatpuffer pH 7,6 (siehe 2.1.1.3.4.)
2. Markierungspuffer:
   0,05 M Phosphatpuffer + 0,02 g% Natriumazid NaN_3 (2.1.1.1.)

3. Stop-Lösung (erst direkt vor der Markierung zubereiten)
   Saccharoselösung 16 % (w/v) (siehe 2.1.1.1.Nr. 3)
   Kaliumjodid 1 % (w/v) (siehe 2.2.1.2.Nr.7)
   Natriumazid 0,02 g% (w/v) (siehe 2.1.2.1.Nr.3)
4. Wasserstoffperoxid H_2O_2
   Fa. Braun Melsungen, Melsungen;
   Jeweils frisch mit Aqua dest. in 4 Schritten verdünnen
   (100 µl H_2O_2 1:15, 1:150, 1:15000 und 1:15000)
5. Laktoperoxidase (LPO)
   Fa. Calbiochem/ Behringwerke, Marburg/Lahn
6. VLS-hPRL
   Fa. Kabi GmbH, München
   hPRL-Markierungsstandard in silikonisierten Glasgefäßen aufbewahren!
7. ^{125}J-Natriumjodid (siehe 2.2.1.2.Nr. 2)
   Es werden silikonisierte Eppendorf-Gefäße und Pasteurpipetten verwendet.

2.2.2.1. Jodierung

Eine Sephadex G-50 Säule (siehe 2.2.1.2.Nr. 9) wird mit 5 % Albumin (siehe 2.2.1.2.) abgesättigt und mit Markierungspuffer nachgespült. In die Fraktionen 9-20 werden jeweils 20 µl 10% Albuminlösung vorgegeben. Direkt vor der Markierung wird die Stopplösung (siehe 2.2.2.1.Nr.3) angefertigt und H_2O_2 (siehe 2.2.2.1.Nr. 4) mit Aqua dest. verdünnt.
Es werden nacheinander pipettiert:
20 µl ^{125}J (1mCi) (siehe 2.2.1.2.Nr. 2)
Gesamtaktivität bestimmen, dann schnell zugeben.
50 µl hPRL Markierungsstandard
10 µl LPO(möglichst handwarm auftauen)
5 µl H_2O_2
15 sec schütteln, dann
100 µl Stopp-Lösung zugeben und sofort mit der Pipette auf die G-50 Säule auftragen.
1-2mal mit 400 µl 10% Albuminlösung nachspülen, auftragen und die Restaktivität bestimmen (sollte ca. 10-20% der Ge-

samtaktivität maximal betragen)
Der Proteinpeak erscheint bei Fraktion 10-18, der Jodpeak ab Fraktion 20. Anschließend wird der abfallende Schenkel des Proteinpeaks über Sephadex G-75 rechromatographiert.
Es wird nur zum Tracer für den Radioimmunoassay Kaninchen-Globulin zugegeben, nicht beim Tracer für den Radiorezeptorassay.

2.2.3. Radioimmunoassay für humanes Prolaktin

Reagenzien:

1. 0,05 M PO_4-Puffer + 1 % Albumin, pH 7,5
   PO_4-Puffer (siehe 2.2.2.1.Nr.1)
   Serumalbumin (siehe 2.2.1.2. Nr.4)
2. 0,01 M PO_4-Puffer + 0,01M EDTA+ 0,15 M NaCL + 1 % Albumin
   Natriumchlorid
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr. 20451
   Äthylendiamintetraessigsäure EDTA
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 13623
3. Prolaktin-RIA-Kit
   Fa. Serono Pharm. Präparat GmbH, Freiburg
   Der I. Antikörper liegt in 50 µl-Fraktionen in der Verdünnung 1:100 vor und wird mit 19,95 ml 0,05 M PO_4-Puffer + 1% Albumin auf 1: 40000 verdünnt.
   II. Antikörper (Anti-rabbit-Gamma-Globulin)
   Es wird je nach Charge 1:12 bis 1:25 mit 0,05 M PO_4-Puffer + 0,01 M EDTA verdünnt.
5. Kontrollserum
   Als Kontrollserum wird ein Serum von R.W. in der Verdünnung von 1:200 und 1:400 verwendet.
   Für die Standardkurve wird gepooltes Serum mit einem hPRL-Gehalt von 4000 µE verwendet und auf 4000 µE, 2000µE, 800µE,400µE, 200 µE, 100 µE, 40 µE und 20 µE/ml verdünnt.

Ansatz:

Sämtliche Inkubationen werden bei +4°C durchgeführt. Dabei beträgt die Dauer der Vorinkubation (kalt) 3 Tage, der Tracerinkubation (heiß) 2 Tage und die der Inkubation mit dem II.Antikörper einen Tag.
Die Seren, bei denen erhöhte hPRL-Spiegel erwartet werden, werden mit 0,05 M PO_4-Puffer + 1% Albumin verdünnt.

Erster Ansatztag:

0,2ml 0,01M PO_4-Puffer + 0,01M EDTA + 0,15M NaCl + 1% Albumin + 0,1ml Standart bzw. Serum + 0,1ml I.Antikörper.

Es werden 6 B_o-Werte statt mit 0,1ml Standart mit 0,1ml 0,05M PO_4-Puffer + 1% Albumin angesetzt. 6 N-Werte werden mit 0,4ml 0,05M PO_4-Puffer + 1% Albumin angesetzt. Nach drei Tagen Inkubation wird der hPRL-Tracer zugegeben, der in der Gebrauchsverdünnung mit dem Zusatz von 0,5% Kaninchen-Normalserum vorliegt (siehe Markierung 2.2.1.).
Nach weiteren 2 Tagen Inkubation bei 4°C werden 0,1ml II.Antikörper (Verdünnung je nach Charge) zugegeben. Die Trennung am Tag darauf erfolgt durch Zentrifugation und Absaugen des Überstandes. Gezählt werden die Proben für jeweils 2 Minuten im Gamma-Counter.

Inkubation und eingesetzte Volumina beim hPRL-RIA:

	Vorinkubation 3 Tage				Tracerinkubat. 2 Tage	II.Antikörper Inkubat.
	hPRL-Standart	PO_4-puffer +EDTA +NaCl +Albumin	Patient.-serum	I.Antikörper	^{125}J-hPRL	II.Antikörper
	ml	ml	ml	ml	ml	ml
T	-	-	-	-	0,1	-
N	-	0,4	-	-	0,1	0,1
B_o	-	0,3	-	0,1	0,1	0,1
S	0,1	0,2	-	0,1	0,1	0,1
P	-	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1

Erklärungen:
T=Gesamtaktivität (30000 counts/2min)
N=Unspezifische Bindung (1000 counts/2min)
B_o=Leerwert (30-35% von T)

S=Standardkurve
P=Unbekannte Serumprobe

2.3. Aufbau eines Radiorezeptorassays für Prolaktin

2.3.1. Bindung von ^{125}J-Prolaktin an die Schichten I-IV des diskontinuierlichen Gradienten

Reagenzien:

1. Kaninchenmikrosomen, gewonnen nach der Methode nach Ray (91) (siehe 2.1.2.)
2. Tris-Puffer $C_4H_{11}NO_3$ 0,025M
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 8382

   Calciumchlorid $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,01M
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 2382

   Natriumazid NaN_3 0,02 g%
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 6688

   Puffereinstellung auf pH 7,5 mit HCL,rauchend 37%
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 317
3. Natriumacetatpuffer 0,025 M
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 302

   Einstellen auf pH 5,4 mit Essigsäure 20%
   Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 807
4. Kühlzentrifuge PR-600 C
   Damon/EC Division
   Biotronic Wiss. Geräte GmbH, Frankfurt/Main
5. Prolaktin-Standard (markiert nach der Chloramin-T Methode siehe 2,2.1.)
   Fa. Kabi, München

Ansatz:

B_o:
100 µl Kaninchenmikrosomen der jeweiligen Schicht +
100 µl Tris-Puffer +
100 µl Tracer
Leerwert N:
200 µl Tris-Puffer +
100 µl Tracer

Nach 6 Stunden Inkubation bei 30°C im Inkubator, wird die Bindungsreaktion mit 500 µl Natriumacetatpuffer gestoppt und in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Danach wird der

Rückstand vorsichtig vom Überstand mithilfe einer Pasteurpipette getrennt. Die Rückstände werden nun im Counter gezählt. Die Leerwerte werden jeweils abgezogen.

2.3.2. Vergleich der Bindung des ^{125}J-Prolaktin-Tracers, markiert nach der Chloramin-T-Methode, der Laktoperoxidasemethode und des 100000g-Rückstands der Präparation nach Friesen,Tsushima,Posner (102) mit der Schicht II des diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten.

Reagenzien:
100000 g-Rückstand der Präparation nach Friesen, Tsushima, Posner (Siehe 2.1.1.)
Schicht II des diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten (siehe 2.1.2. Kaninchenleberpräparation)
Schicht II des diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten (siehe 2.1.2. Rattenleberpräparation)
hPRL-Standard (markiert nach der Chloramin-T Methode (2.2.1.) Fa. Kabi, München
hPRL-Standard (markiert nach der Laktoperoxidase Methode (siehe 2.2.2.)
Natriumacetatpuffer (siehe 2.3.1.)
Kühlzentrifuge (siehe 2.3.1.)
γ-Counter (siehe 2.3.1.)

Ansatz:
B_o:
100µl Tris-Puffer
100µl Tracer
100µl Mikrosomen der jew. Präparation
Leerwert N:
200µl Trispuffer
100µl Tracer

Die Lebermikrosomen wurden auf den gleichen Proteingehalt verdünnt, gemessen mit der Lowry-Methode (siehe 2.1.1.3.6.) Dann verfährt man wie unter 2.3.1. beschrieben: Zuerst pipettiert man Mikrosomen des 100000g Rückstandes, der Schicht II der Rattenleberpräparation, der Schicht II der Kaninchenleberpräparation in jeweils ein Reagenzglas, gibt 100 µl Puf-

fer und 100 µl Tracer hinzu, wobei einmal Chloramin-T Tracer und dann Lactoperoxidase Tracer verwendet wird. Dann stoppt man die Reaktion mit Natriumacetatpuffer. Nach anschließender Zentrifugation in der Kühlzentrifuge 1800rpm/30 min/4°C, wird der Überstand abpipettiert und der Rückstand im Counter gezählt.

2.3.3.1. Kinetik der Rattenleberplasmamembranen

Reagenzien:

Schicht II des diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten der Rattenleberpräparation (siehe 2.1.2.)
Trispuffer (siehe 2.3.1.)
Prolaktin-Tracer markiert nach der Lactoperoxidase Methode (siehe 2.2.2.)
Natriumacetatpuffer (siehe 2.3.1.)
Kühlzentrifuge (siehe 2.3.1.)
γ-Counter (siehe 2.3.1.)

Ansatz:
Bo:
100 µl Mikrosomen
100 µl Tris-Puffer
100 µl Tracer
Leerwert N:
200 µl Tris-Puffer
100 µl Tracer

Variiert wurde jetzt Temperatur und Zeit. Die Proben wurden bei 4°C, 28°C, 30°C, 37°C inkubiert. Die Proben bei 28°C und 37°C wurden im Schüttelbad inkubiert, um die Temperatur im ganzen Reaktionsgefäß gleich zu halten, diejenigen von 4°C wurden im Kühlschrank inkubiert. Verfahren wurde wieder wie unter 2.3.1. beschrieben.

2.3.3.2. Kinetik der Kaninchenleberplasmamembranen

Reagenzien wie in 2.3.3.1. nur Schicht II der Kaninchenleberpräparation (siehe 2.1.2.)

Ansatz wie 2.3.3.2. nur Kaninchenmikrosomen.

Wir überprüften bei den Kaninchenmikrosomen die Bindung in Abhängigkeit der Zeit bei 30°C. Die Reaktion wurde bei 10 Minuten, 60 Minuten, 120 Minuten, 10 Stunden und 24 Stunden gestoppt und dann gezählt.

2.3.4. Interferenzkurven der Kaninchenleberpräparation

Reagenzien und Materialien:

Hyperprolaktinämieserum der Patientin R.S. vom 1.2.77
(Radioimmunoassaybestimmung 100000µE/ml)
Human Growth Hormon 60 ng/600µl
Fa. Kabi, München;
Kaninchenmikrosomen (siehe 2.1.2.)
Tris-Puffer (siehe 2.3.1.)
Natriumacetatpuffer (siehe 2.3.1)
Kühlzentrifuge (siehe 2.3.1.)
γ-Counter (siehe 2.3.1.)
hPRL-Tracer, markiert nach der Chloramin-T Methode (siehe 2.2.1.)

Ansatz:

B_o:
100µl Kaninchenmikrosomen +
100µl Tracer +
200µl Tris-Puffer + 0,1g% Albumin

Leerwert :
300µl Trispuffer +
100µl Tracer

hGH-Standard
100µl Kaninchenmikrosomen +
100µl Tracer +
100µl hGH-Standard (1000ng, 500ng, 100ng, 50ng, 10ng/100µl)

Serum eines Patienten mit einem Prolaktin produz. Hypophysentumor:
100µl Membranen +
100µl Tracer +
100µl Serum (10000µE/100µl, 1000µE/100µl, 100µE/100µl,
50µE/100µl, 25µE/100µl, 5µE/100µl, 1µE/100µl)

Für den B_0-Wert werden jeweils 6 Proben angefertigt und bei 30°C im Inkubator 6 Stunden inkubiert. Für die Seruminterferenzkurve verwendeten wir Patientenserum, das bei der Radioimmunoassaybestimmung 100000µE/ml Prolaktin enthielt. Wir fertigten jeweils drei Proben mit 10000, 1000, 100, 50, 25, 5 und 1 µE pro jeweils 100 µl hPRL an und inkubierten ebenso bei 30°C im Inkubator. Auch bei der hGH-Interferenzkurve arbeiteten wir mit je drei Proben: 1000ng/100µl, 500ng/100µl, 100ng/100µl, 50ng/100µl, 10ng/100µl. Nach 6 Stunden Inkubationszeit wurde die Reaktion mit Natriumacetatpuffer gestoppt und in der Kühlzentrifuge 30 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaut und der Rückstand im γ-Counter gezählt (counts/min). Der Proteingehalt der Proben betrug 239 µg/Tube.

2.3.5. Standardkurve der Rattenleberpräparation

Reagenzien und Materialien:

hPRL-Tracer, gewonnen nach der Lactoperoxidase Methode (siehe 2.2.2.1.)
Rattenlebermikrosomen nach der Präparation Siehe 2.1.2.
hPRL-Standard aus dem Hyperprolaktinämieserum des Patienten K., Radioimmunoassaybestimmung: 100000 µE/ml
Trispuffer + 0,1 g% Serumalbumin (siehe 2.3.1.)
Natriumacetatpuffer (siehe 2.3.1.)
Kühlzentrifuge (siehe 2.3.1.)
γ-Counter (siehe 2.3.1)

Ansatz:

B_o:
200 µl Tris-Puffer + 0,1 g% Albumin +
100 µl hPRL-Tracer +
100 µl Rezeptoren

Standard:
100 µl Tris-Puffer + 0,1 g% Albumin +
100 µl hPRL-Tracer +
100 µl Standard aus Hyperprolaktinämieserum
(6,25ng/ml, 12,5ng/ml, 25ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml)

Leerwert:
100 µl Tris-Puffer + 0,1 g% Albumin +
100 µl hPRL-Tracer +
100 µl Standard aus dem Serum

Vom B_o-Wert fertigten wir 6 Proben an, von den jeweiligen Serumstandardwerten drei Proben, ebenso vom Leerwert drei Proben. Wir verfahren wie unter 2.3.4..

2.3.6. Sättigungskurve der Rattenleberpräparation

Reagenzien und Materialien:

Mikrosomen der Rattenleberpräparation (siehe 2.1.2.)
hPRL-Tracer gewonnen nach der Lactoperoxidase-Methode (siehe 2.2.2.1.)
Tris-Puffer + 0,1 g% Albumin (siehe 2.3.1.)
Natriumacetatpuffer (siehe 2.3.1.)
Kühlzentrifuge (siehe 2.3.1.)
γ-Counter (siehe 2.3.1.)

Ansatz:

B_o:
100 µl Tris-Puffer +
100 µl hPRL-Tracer +
100 µl Rezeptoren

Leerwert N:
100 µl Tris-Puffer +
100 µl Tracer +
100 µl Standard

GA:
100 µl Tracer

Es wurden jeweils 4 B_o-Werte, 2 N-Werte und 2 GA-Werte (= Gesamtaktivität) eingesetzt. Als Tracerkonzentration wählten wir sieben verschiedene Verdünnungen, von 125000 cpm bis 8000 cpm. Die Proben wurden 3 Stunden im Schüttelwasserbad bei 30°C inkubiert, mit 500 µl Natriumacetatpuffer gestoppt, in der Kühlzentrifuge bei 1800 rpm 30 min zentrifugiert, abgesaugt und gezählt.

2.3.7. Interferenzkurven der Rattenleberpräparation

Reagenzien und Materialien:

Mikrosomen der Rattenleberpräparation (siehe 2.1.2.)
hPRL-Standard aus dem Hyperprolaktinämieserum des Patienten K. (Radioimmunoassaybestimmung:100000µE/ml), verdünnt mit Tris-Puffer
hGH-Standard
Fa. Kabi, München
hPL-Standard
Fa. Kabi, München
Tris-Puffer + 0,1 g% Albumin (siehe 2.3.1.)
Natriumacetatpuffer (siehe 2.3.1.)
Kühlzentrifuge (siehe 2.3.1.)
γ-Counter (siehe 2.3.1.)

Ansatz:

B_o:
200 µl Tris-Puffer
100 µl hPRL-Tracer +
100 µl Mikrosomen

hPRL-Standard aus Serum:
100 µl Tris-Puffer +
100 µl hPRL-Tracer +
100 µl Mikrosomen +
100 µl Serum (6,25ng/ml, 12,4ng/ml, 25ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml 200ng/ml)

hPL Interferenz:

100 µl Tris-Puffer
100 µl hPRL-Tracer +
100 µl Mikrosomen +
100 µl hPL (1000ng/ml, 2000ng/ml, 4000ng/ml, 8000ng/ml, 16000ng/ml, 32000ng/ml)

hGH Interferenz:

100 µl Tris-Puffer +
100 µl hPRL-Tracer +
100 µl Mikrosomen +
100 µl hGH (7,1ng/ml, 14,1ng/ml, 29,4ng/ml, 65,5ng/ml, 120ng/ml
254ng/ml, 500ng/ml, 1010ng/ml)

Vom B_o-Wert wurden sechs Proben, von den hPRL-Serumverdünnungen 3 Proben, von den hGH-Standardverdünnung drei Proben und von den hPL-Standardverdünnungen drei Proben und vom Leerwert drei Proben im Schüttelbad (Inkubator), bei 30°C, drei Stunden inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion mit Natriumacetatpuffer, zentrifugierten wir die Proben 30 Minuten in der Kühlzentrifuge mit 1800 rpm, saugten den Überstand ab und zählten den Rückstand im γ-Counter. Die Proteinkonzentration bei 385µg/100µl.

2.3.8. Scatchard-Plot

Der Scatchard-Plot ist eine besondere graphische Darstellung des Massenwirkungsgesetzes. Die Umformung des Massenwirkungsgesetzes lautet:

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_d}(B - n)$$

B = Bindung an die Membran, n = unspezifische Bindung
F = freies Hormon nach Erreichen des Bindungsgleichgewichts
K_d = Assoziations-und Dissoziationskonstante nach Erreichen des Gleichgewichts (=Gleichgewichtskonstante)

Drei Voraussetzungen sind notwendig, um einen Scatchard-Plot anfertigen zu können:

1. ungebundenes Hormon = freies Hormon
2. die Anzahl der Bindungsstellen bleibt während der Inkubationszeit die gleiche d.h. Bindungsstellen werden während der Inkubation weder inaktiviert noch gehen sie auf andere Weise verloren.
3. die Reaktion ist vollständig reversibel während der Inkubationszeit.

3. ERGEBNISSE

3.1. Saccharose-Eichkurve

Zur Auftrennung des Rückstand R_3 (siehe 2.1.2.1.) mithilfe eines diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten muß R_3 zuerst mit einer 70 %igen (w/w) Saccharoselösung auf die Dichte einer 48 %igen Saccharoselösung eingestellt werden. Die jeweilige Konzentration der Saccharoselösung wird anhand einer Eichkurve mit der im Abbé-Refraktometer gemessenen Brechungszahl d abgelesen (siehe 2.1.2.2.1.)

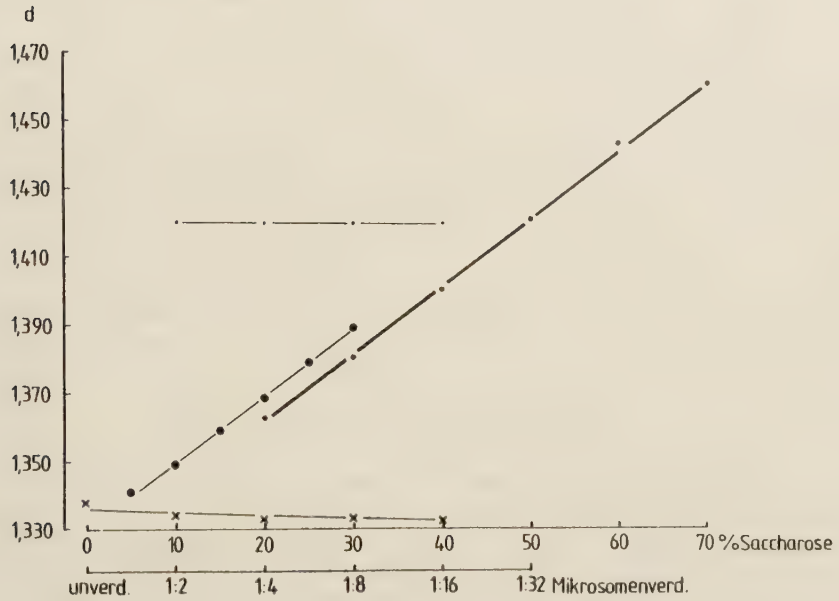

Abb. 6: Saccharose-Eichkurve

o ——o Saccharoselösung: Konzentration (w/w): 10/20/30/40/50/60/70 %

x ——x Mikrosomensuspension (3mg Protein/ml) Verdünnungen mit Tris-Puffer: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16.

● ——● Je 1 Teil Saccharoselösung und je 1 Teil unverdünnte Mikrosomensuspension (3mg Protein/ml)

• ——• Je 2 Teile Saccharoselösung 70 % (w/w) und je 1 Teil Mikrosomensuspension: unverdünnt, bzw. 1:2, 1:4, 1:8, 1:16.

Mit steigender Konzentration der Saccharoselösung steigt direkt proportional die im Abbe-Refraktometer gemessene Brechungszahl n. In Anwesenheit von 1,5 mg Protein/ml in den Saccharoselösungen verläuft die Standargerade zu höheren Refraktometerwerten parallel verschoben (d = 0,008).
Die Brechungszahlen einer Verdünnungsreihe der Mikrosomensuspension (3 mg Protein/ml) ergeben eine zur niedrigsten Konzentration hin leicht abfallende Gerade. Die Brechungszahl liegt zwischen 1,338 bei unverdünnter Mikrosomensuspension und 1,332 bei einer 1:16-Verdünnung.
Der maximale Fehler, den man bei Nichtberücksichtigen der Brechungszahl der Mikrosomen macht, beträgt ungefähr 4 % (w/w) bei Anwesenheit von 1,5 mg Protein/ml. Die Konzentration einer unbekannten Zuckerlösung kann also bei bekannter Brechungszahl an der Eichkurve abgelesen werden.
Bei Einstellung von R_3 auf 48 % für den diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten, muß an der Mikrosomen-Saccharose-Eichkurve abgelesen werden (d = 1,425) (siehe 2.1.2.2.3.)

Bei der Verteilung der einzelnen Bestandteile von R_3 entlang der angefertigten kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten (siehe 2.1.2.2.2.2.) war der Gehalt der einzelnen 1 ml-Fraktionen dieser Gradienten an Protein so gering, daß jeweils an der Saccharose-Eichkurve abgelesen werden konnte.

3.2. Kontinuierliche Saccharose-Dichte-Gradienten

Wie unter 2.1.2.2.2. beschrieben, wurden kontinuierliche Saccharose-Dichte-Gradienten gebildet.

3.2.1. Nachweis der Linearität des Saccharose-Dichte-Gradienten mit Nilblausulfatverdünnung und Refraktometermessung (siehe 2.1.2.2.2.1.)

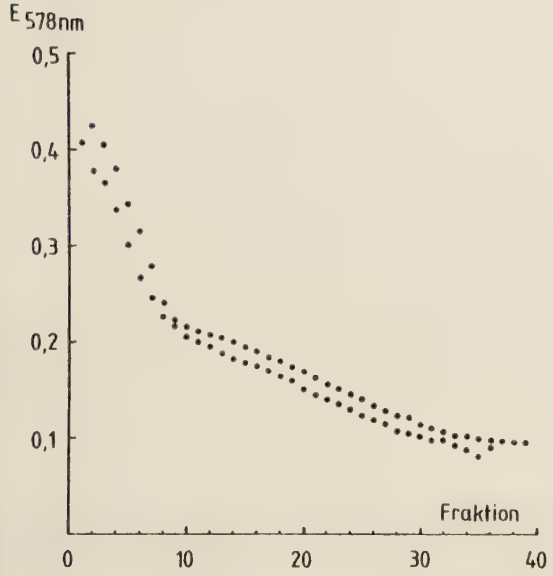

Abb. 7:
Extinktion der 1 ml-Fraktionen eines Saccharose-Dichte-Gradienten, gemessen im Eppendorf-Photometer

vor: • ——— •

nach: o ——— o
der Ultrazentrifugation bei 578 nm.

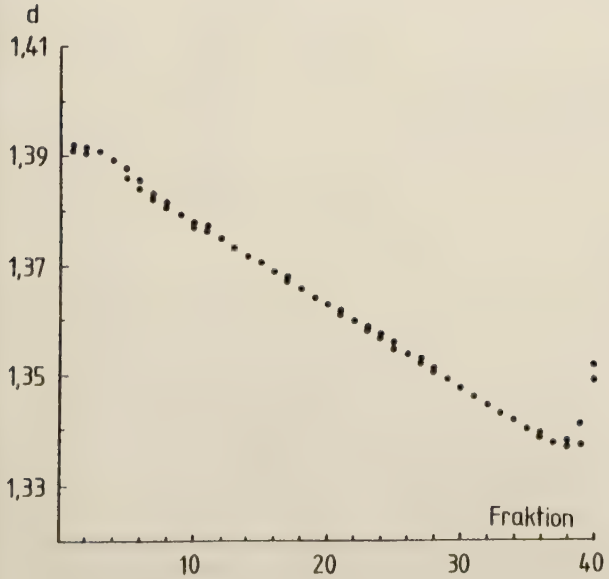

Abb. 8:

Refraktometerwerte (d) der 1 ml-Fraktionen

vor: • ——— •

nach: o ——— o
der Ultrazentrifugation

Die Messung der 1 ml-Fraktionen im Eppendorf-Photometer bei 578 nm zeigt ungefähr ab der Fraktion 9 einen kontinuierlich abnehmenden Verlauf, sowohl vor als auch nach der Ultrazentrifugation.
An der Grenzschicht zwischen den 5 ml der 35 %igen Lösung und dem Gradienten erfolgt scheinbar eine leichte Mischung.
Auch die Messungen mit dem Refraktometer zeigen vor und nach der Zentrifugation kontinuierlich abnehmende Werte (ungefähr ab Fraktion 5). Die Durchmischung an der Grenzschicht scheint hier geringer zu sein.
Es läßt sich also mit der in 2.1.2.2.2.1. beschriebenen Versuchsanordnung ein kontinuierlich abnehmender Saccharose-Dichte-Gradient bilden, der auch bei der Ultrazentrifugation nicht wesentlich verändert wird.

3.2.2. Proteinverteilung der Fraktion R_3 entlang eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten. (siehe 2.1.2.2.2.2.)

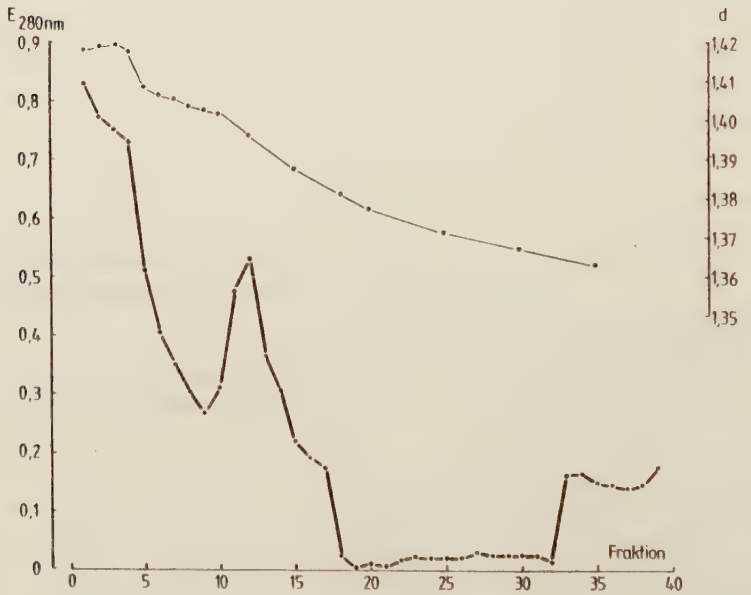

Abb. 9: Proteinverteilung entlang eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten von 46-20%, gemessen im UV-Photometer bei 280 nm •———•
Entsprechender Refraktometerwert der jew. Fraktion •———•(d)

Der Rückstand R_3 (siehe 2.1.2.1.) wurde auf 48 %-Dichte eingestellt und über 5 ml dieser Suspension wurde ein kontinuierlicher Saccharose-Dichte-Gradient von 46 bis 20 % gebildet. Nach der Zentrifugation wurden die 1 ml-Fraktionen im UV-Photometer bei 280 nm gemessen.
Die Proteinverteilung entlang des kontinuierlichen Gradienten zeigt drei Peaks. Am Boden des Röhrchens bleibt der Rückstand.

Der Peak 1 erstreckt sich von einer Saccharosekonzentration von 48 % bis 41 %, Maximum bei 47 %.
Der Peak 2 reicht von 41 % bis 32 %, Maximum bei 37,5 %. Die oberste Proteinschicht (Peak 3) erstreckt sich von 22 % bis 20 %.

3.2.3. Verteilung des Peaks 2 entlang eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten von 48% bis 32% (siehe 2.1.2.2.2.2.)

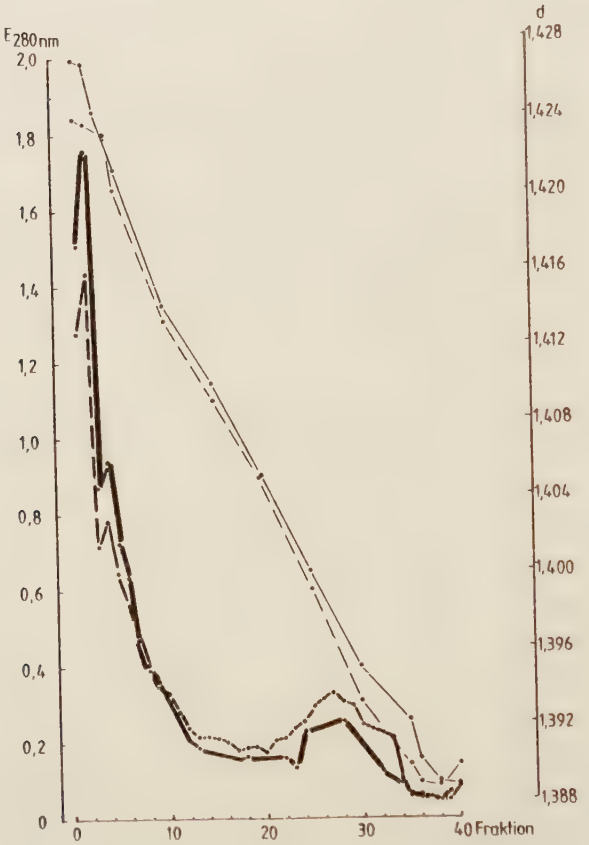

Abb. 10: Proteinverteilung des Peak 2 entlang eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten von 48% bis 32%, gemessen im UV-Photometer bei 280 nm

Entsprechender Refraktometerwert d (nicht jede Fraktion wurde gemessen)

Der Peak 2 (siehe 3.2.2.) wurde auf 50%-Dichte eingestellt und über 5 ml dieser Suspension wurde ein kontinuierlicher Saccharose-Dichte-Gradient von 48% bis 32% gebildet. Es folgte eine Ultrazentrifugation und Fraktionierung des Gradienten in 1ml-Fraktionen.
Die Messung der Fraktionen im UV-Photometer ergibt einen deutlichen Peak zwischen Fraktion 22 und 35, entsprechend etwa 41% und 35% (Maximum bei Fraktion 27 d.h. 37%)

3.2.4. Verteilung der Schicht I des diskontinuierlichen Gradienten (siehe 2.1.2.2.3.) entlang eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten von 39% bis 28%.

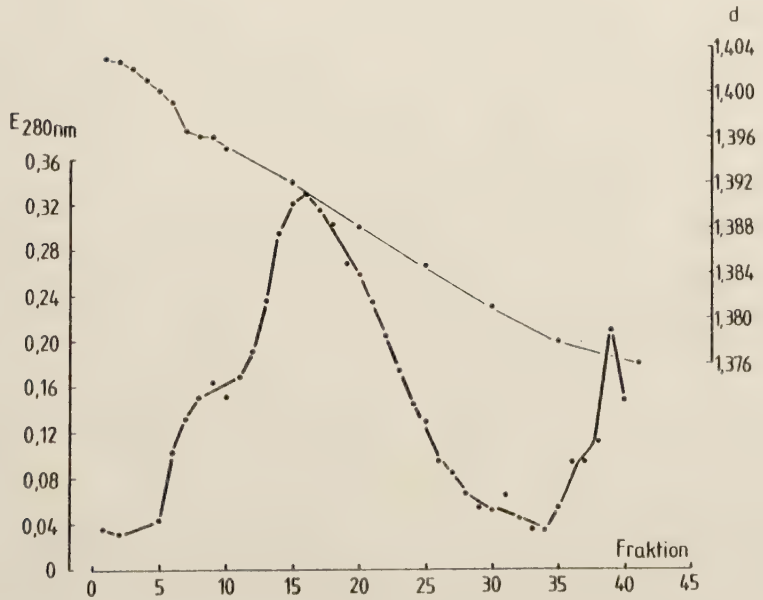

Abb. 11: Proteinverteilung der Schicht I des diskontinuierlichen Gradienten entlang eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten von 39% bis 28%, gemessen im UV-Photometer bei 280 nm

Entsprechender Refraktometerwert d (nicht jede Fraktion ist gemessen worden)

Die Schicht I des diskontinuierlichen Gradienten oberhalb von 37% wird auf 40%-Dichte eingestellt und ein kontinuierlicher Saccharose-Dichte-Gradient von 39% bis 28% darübergeschichtet.
Der höchste Proteingehalt ist zwischen den Fraktionen 5 bis 22 zu finden, was einer Saccharosekonzentration von 39% bis 30% entspricht, mit einem deutlichen Maximum bei Fraktion 16, etwa 35%.

3.2.5. Verteilung der Schicht II des diskontinuierlichen Gradienten (siehe 2.1.2.2.3.) entlang eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten von 40% bis 35%.

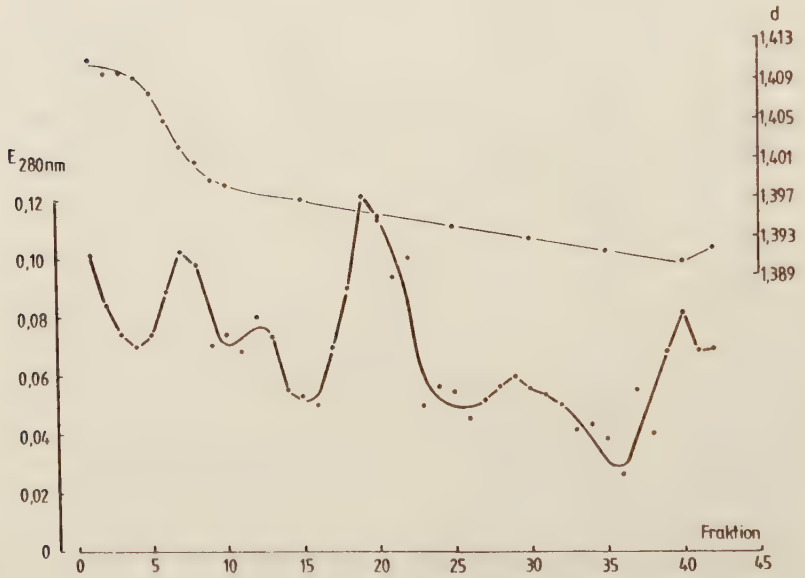

Abb. 12: Proteinverteilung der Schicht II des diskontinuierlichen Gradienten entlang eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten von 40% bis 35%, gemessen im UV-Photometer bei 280nm

Entsprechender Refraktometerwert d (nicht jede Fraktion ist gemessen worden)

Die Schicht II des diskontinuierlichen Gradienten zwischen 41% und 37% wurde auf 45% eingestellt und darüber ein kontinuierlicher Saccharose-Dichte-Gradient von 40% bis 35% gebildet.
Die Proteinverteilung nach der Zentrifugation zeigt eine allmähliche Abnahme zu niedrigen Konzentrationen hin. Ein deutlicher Peak zeichnet sich bei etwa 37,5% ab. Die Schicht II enthält vor allem Anteile zwischen 40% und 36%-Dichte.

3.3. Enzymtests (siehe 2.1.1.3.)

3.3.1. Proteinbestimmung nach Lowry (siehe 2.1.1.3.6.)

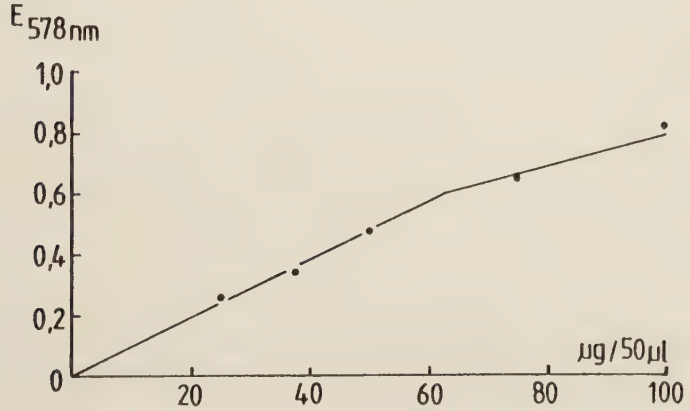

Abb. 13: Albumin-Standardkurve, gemessen im Eppendorf-Photometer bei 578 nm.

Die mit 25µg, 37,5µg, 50µg, 75µg und 100µg Albumin/50µl-Konzentrationen erstellte Standardkurve dient zur Ermittlung der unbekannten Proteinkonzentration einer Probe aus der gemessenen Extinktion bei 578 nm im Photometer nach Durchführung des Tests nach Lowry. Die Kurve setzt sich aus zwei Geraden verschiedener Steigung zusammen. Zu jedem neuen Testansatz ist eine neue Standardkurve zu erstellen.

3.3.2. 5'-Nukleotidase (E.C.3.1.3.5.)

Es wurde zuerst der Test nach Nathan und Aronson (siehe 2.1.1.2.1) durchgeführt und im Testansatz als Probe verschiedene Mengen einer Suspension der Schicht II des diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten (siehe 2.1.2.2.3.) eingesetzt (100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl, 500 µl, jeweils mit Puffer ergänzt auf 500 µl).
Zusätzlich wurde zu jeder Probe ein Blindwert mitgeführt, bei dem schon vor der Inkubation der Proben jeweils 0,5 ml 20%ige Trichloressigsäure zugegeben und damit die Reaktion verhindert wurde. Der Blindwert ist somit Maß für die schon in der Probe ohne Reaktion vorhandene Phosphatmenge.

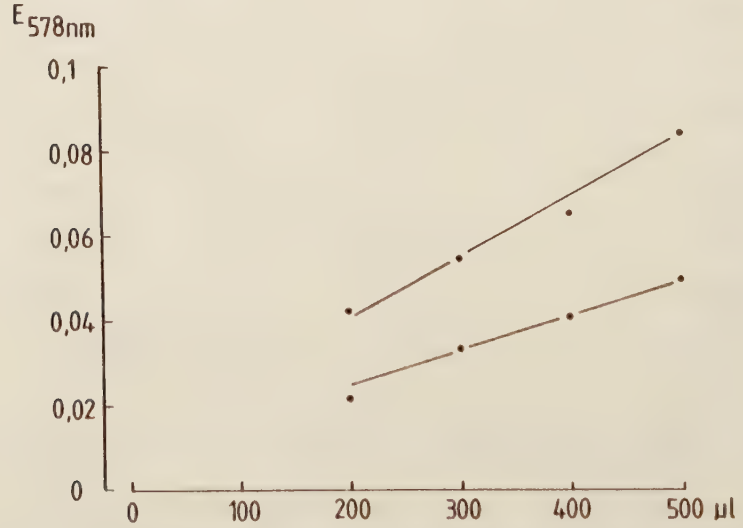

Abb. 14: 5'-Nukleotidase-Test nach Nathan, Aronson(28). Linear steigende Bildung von Phosphat bei Einsatz von steigenden Mengen der Schicht II eines diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten

o——o Blindwerte

Es zeigt sich ein linearer Anstieg der Phosphatbildung bei Einsatz von steigenden Mengen der Schicht II des diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten.

Anschließend wurde mit dem Test nach Nathan und Aronson (siehe 2.1.1.3.1.) die 5'-Nukleotidase-Aktivitäten der Schichten I-V (siehe 2.1.2.2.3.) eines diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten bestimmt.

Kaninchen A						
Schicht a	I	II	III	IV	V	Homogenat
spezifische Enzymaktivität U/g	26	16	6	6	7,1	6,4
Schicht a Homogenat	4,06	2,5	0,94	0,94	1,11	1
Kaninchen B						
Schicht a	I	II	III	IV	V	Homogenat
spezifische Enzymaktivität U/g	36	22	13,3	3,2	7,7	11
Schicht a Homogenat	3,27	2	1,21	0,29	0,7	1

Tab.: 5'-Nukleotidase-Test nach Nathan, Aronson(28) für Schicht I-V von Kaninchen A und B (Mittelwert aus drei Meßwerten) Quotient aus der spezifischen Enzymaktivität von Schicht a und Homogenat. Es wurde ein diskontinuierlicher Gradient mit den Konzentrationen 48%/45%/41%/35% verwendet.

Es ergibt sich für den Plasmamembranen-Marker 5'-Nukleotidase eine 3 - 4-fache Anreicherung gegenüber dem Homogenat in Schicht I und eine 2 - 2,5-fache Anreicherung in Schicht II. Die Plasmamembranen befinden sich offenbar in Schicht I und II.

Da die Schicht I des diskontinuierlichen Gradienten sehr dünn und sehr fettreich war, zudem beim Absaugen mit der Pasteur-Pipette ein Teil der obersten Schicht leicht an der Röhrchenwand hängenbleibt, wurde versucht, die Membranen der Schicht I bei den weiteren Präparationen dadurch mit in die Schicht II zu bekommen, indem die bisher niedrigste Konzentration des diskontinuierlichen Schichtengradienten von 37% auf 35% verringert wurde.

Es wurde also bei den weiteren diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten zur Präparation von Plasmamembranen der Rückstand R_3 (siehe 2.1.2.1.) auf 48% eingestellt und darüber folgende Saccharosekonzentrationen geschichtet: 45%, 41%, 35%.

Es wurde dann mit dem Test nach Gerlach (siehe 2.1.1.3.2.) die 5'-Nukleotidase-Aktivität der nach der Zentrifugation dieses Gradienten gewonnenen Schichten I-V gemessen.

Kaninchen D							
Schicht a	I	II	III	IV	V	Rückstand R_3	Homogenat
spezifische Enzymaktivität U/g	3,86	9,18	0,94	0,27	2,5	2,35	3,06
Schicht a Homogenat	1,26	3	0,31	0,09	0,82	0,77	1
Schicht a Rückstand R_3	1,64	3,91	0,4	0,11	1,06	1	1,3

Kaninchen E:						
Schicht a	I	II	III	IV	V	Rückstand R_3
spezifische Enzymaktivität U/g	5,39	9,8	2,58	2,25	2,8	2,1
Schicht a Rückstand	2,57	4,67	1,23	1,07	1,33	1

Tab. 5'-Nukleotidase-Test nach Gerlach für Schicht I-V von Kaninchen D und E,(Mittelwert aus 3 Meßwerten) Quotient aus der spezifischen Enzymaktivität von Schicht a und Homogenat und Schicht a und Rückstand R_3. Es wurde ein diskontinuierlicher Gradient mit den Konzentrationen 48%/ 45%/ 41% 35% verwendet.

Es wurden bei diesem Test nach Gerlach durchwegs niedrigere spezifische Enzymaktivitäten gemessen als mit dem Test nach Aronson.
Es ergaben sich Anreicherungen in der Schicht I von 1,26, in der Schicht II von 3,0 gegenüber dem Homogenat und gegenüber dem Rückstand R_3 eine Anreicherung in Schicht I zwischen 1,64 und 2,57 und in Schicht II zwischen 3,9 und 4,67.

Dahingegen wurde bei der 100000g-Fraktion der Präparation nach Tsushima, Friesen, Posner (102) eine spezifische Enzymaktivität von 6,9 U/g gegenüber einer Aktivität des Homogenats von 4,09 U/g gefunden. Das bedeutet eine Anreicherung von 1,69.

3.3.3. NADPH-Cytochrom-C-Reduktase (28)

Kaninchen A:						
Schicht a	I	II	III	IV	V	Homogenat
spezifische Enzymaktivität U/g	25,9	39	47,4	68,3	41,2	112,7
Schicht a / Homogenat	0,23	0,35	0,42	0,61	0,37	1
Kaninchen C:						
Schicht a	I	II	III	IV	V	Homogenat
spezifische Enzymaktivität U/g	32,3	35,7	24,4	71,9	8,7	346,2
Schicht a / Homogenat	0,09	0,1	0,07	0,21	0,02	1

Tab: NADPH-Cytochrom-C-Reduktase-Test für Schicht I-V von Kaninchen A und C.(Mittelwert aus 3 Meßwerten)
Quotient aus der spezifischen Enzymaktivität von Schicht a und Homogenat.
Es wurde ein diskontinuierlicher Gradient mit den Konzentrationen 48%/ 45%/ 41%/ 37% verwendet.

Kaninchen D:							
Schicht a	I	II	III	IV	V	Rück-stand	Homoge-nat
spezifische Enzym-aktivität U/g	62	41,5	75,2	134,4	11,3	103	113,7
Schicht a Homogenat	0,55	0,36	0,66	1,18	0,1	0,91	1
Schicht a Rückstand R_3	0,6	0,4	0,73	1,3	0,11	1	1,1

Tab.: NADPH-Cytochrom-C-Reduktase-Test für Schicht I-V von Kaninchen D. (Mittelwert aus 3 Meßwerten) Quotient aus der spezifischen Enzymaktivität von Schicht a und Homogenat und Schicht a und Rückstand R_3. Es wurde ein diskontinuierlicher Gradient mit den Konzentrationen 48%/ 45%/ 41%/ 35% verwendet.

Es zeigt sich in Schicht IV jeweils der größte Anteil der spezifischen Enzymaktivität des Homogenats. Der Quotient aus der spezifischen Enzymaktivität von Schicht II und dem Homogenat liegt zwischen 0,4 und 0,36.
Der Quotient aus der spezifischen Enzymaktivität der NADPH-Cytochrom-C-Reduktase von der 100000g-Fraktion der Präparation nach Tsushima, Friesen und Posner (102) und dem Homogenat betrug 0,83.

3.3.4. Glucose-6-Phosphatase-Test (28) [E.C.1.1.1.4.9.]

Kaninchen F:						
Schicht a	I	II	III	IV	V	Homogenat
spezifische Enzym-aktivität U/g	71	90	138	252	282	548
Schicht a Homogenat	0,13	0,16	0,25	0,46	0,51	1

Tab.: Glucose-6-Phosphatase-Test (28) für Schicht I-V von Kaninchen F (Mittelwert aus 3 Meßwerten)
Quotient aus der spezifischen Enzymaktivität von Schicht a und Homogenat
Es wurde ein diskontinuierlicher Gradient mit den Konzentrationen 48%/ 45%/ 41%/ 35% verwendet.

Es zeigt sich in Schicht IV und V jeweils der größte Anteil der spezifischen Aktivität des Homogenats. Schicht I wurde gegenüber dem Homogenat um das 9-10 fache gereinigt, Schicht II um das 6 fache.

Kaninchen G:						
Schicht a	I	II	III	IV	V	Homogenat
spezifische Enzym-aktivität U/g	20	25	147	102	96	191
Schicht a Homogenat	0,10	0,13	0,77	0,53	0,50	1

Tab. : Glucose-6-Phosphatase-Test für Schicht I-V von Kaninchen G (Mittelwert aus 3 Meßwerten)
Quotient aus der spezifischen Enzymaktivität von Schicht a und Homogenat.
Es wurde ein diskontinuierlicher Gradient mit den Konzentrationen 48%/ 45%/ 41%/ 35% verwendet.

Es zeigt sich in Schicht III, IV und V der größte Anteil der spezifischen Aktivität des Homogenats. Schicht I wurde gegenüber dem Homogenat um das 9 fache gereinigt, Schicht II um das 8 fache.

3.3.5. Citrat-Synthase-Test (28)

Zum Nachweis der Mitochondrien wurde der Citrat-Synthase-Test (siehe 2.1.1.3.3.) angewendet.

Kaninchen F						
Schicht a	I	II	III	IV	V	Homogenat
spezifische Enzymaktivität U/g	92	96	813	652	-	1999
Schicht a Homogenat	0,04	0.04	0,4	0,3		1

Tab.:Citrat-Synthase-Test (28) für Schicht I-V von Kaninchen F
Quotient aus der spezifischen Enzymaktivität von Schicht a und Homogenat.
Es wurde ein diskontinuierlicher Gradient mit den Konzentrationen 48%/ 45%/ 41%/ 35% verwendet.

Schicht I und Schicht II wurde gegenüber dem Homogenat um das 20-fache gereinigt.

Kaninchen G						
Schicht a	I	II	III	IV	V	Homogenat
spezifische Enzym-aktivität U/g	59	78	245	323	57,5	870
Schicht a Homogenat	0,06	0,08	0,28	0,38	0,06	1

Tab.: Citrat-Synthase-Test für Schicht I-V von Kaninchen G Quotient aus der spezifischen Enzymaktivität von Schicht a und Homogenat.

Es wurde ein diskontinuierlicher Gradient mit den Konzentrationen 48%/ 45%/ 41%/ 35% verwendet.

Schicht I und Schicht II wurde gegenüber dem Homogenat um das 10 - 14 fache gereinigt.

3.3.6. 5'-Nukleotidase-Test (28) [E.C. 3.1.3.5.]

Für die Rattenleberpräparation wurden ebenso die Enzymteste durchgeführt; für die Plasmamembranen verwendeten wir wieder den 5'-Nukleotidase-Test (siehe 2.1.1.3.2.) für das endoplasmatische Retikulum den NADPH-Cytochrom-C-Reduktase-Test (siehe 2.1.1.3.4.) für den Mitochondriennachweis den Citratsynthase-Test (siehe 2.1.1.3.3.)

ca. 20 Rattenlebern gepoolt						
Schicht a	I	II	III	IV	V	Homogenat
spezifische Enzymaktivität U/g	27	29	14	9	7	11,4
Schicht a Homogenat	2,37	2,54	1,23	0,79	0,61	1

Tab.: 5'-Nukleotidase-Test nach Nathan, Aronson (28) für Schicht I-V der Rattenleberpräparation (Mittelwert aus 3 Meßwerten)
Quotient aus der spezifischen Enzymaktivität von Schicht a und Homogenat.
Es wurde ein diskontinuierlicher Gradient mit den Konzentrationen 48%/ 45%/ 41%/ 35% verwendet.

Es ergibt sich für den Plasmamembranen-Marker 5'-Nukleotidase eine 3-4fache Anreicherung gegenüber dem Homogenat in Schicht I und eine 2-2,5 fache Anreicherung in Schicht II.

3.3.7. NADPH-Cytochrom-C-Reduktase (28)

ca. 20 Rattenlebern gepoolt						
Schicht a	I	II	III	IV	V	Homogenat
spezifische Enzym - aktivität U/g	49	33	55	59	43	52
Schicht a Homogenat	0,94	0,63	1,06	1,13	0,83	1

Tab.: NADPH-Cytochrom-C-Reduktase-Test für Schicht I- V der Rattenleberpräparation(Mittelwert aus 3 Meßwerten)
Quotient aus der spezifischen Enzymaktivität von Schicht a und Homogenat.
Es wurde ein diskontinuierlicher Gradient mit den Konzentrationen 48%/ 45%/ 41%/ 35% verwendet.

Es zeigt sich in Schicht IV der größte Anteil der spezifischen Enzymaktivität. Der Quotient aus der spezifischen Enzymaktivität von Schicht II und dem Homogenat liegt zwischen 0,63 und 0,94.

3.3.8. Citratsynthase-Test der Rattenleberpräparation (28)

ca. 20 Rattenlebern gepoolt						
Schicht a	I	II	III	IV	V	Homogenat
spezifische Enzymaktivität U/g	16	7,1	10,5	115	200	232
Schicht a / Homogenat	0,06	0,03	0,04	0,4	0,7	1

Tab.: Citrat-Synthase-Test für Schicht I-V der Rattenleberpräparation (Mittelwert aus drei Meßwerten)
Quotient aus der spezifischen Enzymaktivität und dem Homogenat.
Es wurde ein diskontinuierlicher Gradient von 48%/ 45%/ 41%/ 35% verwendet.

Schicht II wurde gegenüber dem Homogenat um das 16 fache gereinigt.

3.4. Ergebnis der Elektronenmikroskopie

Schicht II eines diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten mit den Konzentrationen 45%/ 45%/ 41%/ 35% der Rattenleberpräparation.

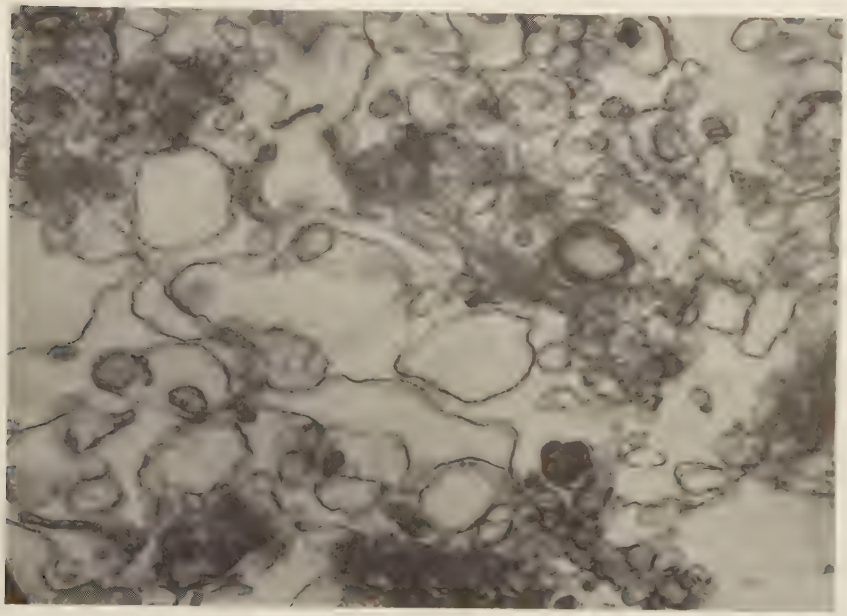

Abb. 15: Elektronenmikroskopie (Osmiumfixation 1: 30000)
Für die Erstellung der Elektronenmikroskopien danken wir Fr. Dr. Gundula Jäger, Inst. für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlenforschung, 8 München 2, Landwehrstr. 61

3.5. Rezeptorcharakterisierung für Prolaktin

3.5.1. Bindung von ^{125}J-Prolaktin an die Schichten I-IV des diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten (siehe 2.3.1.)

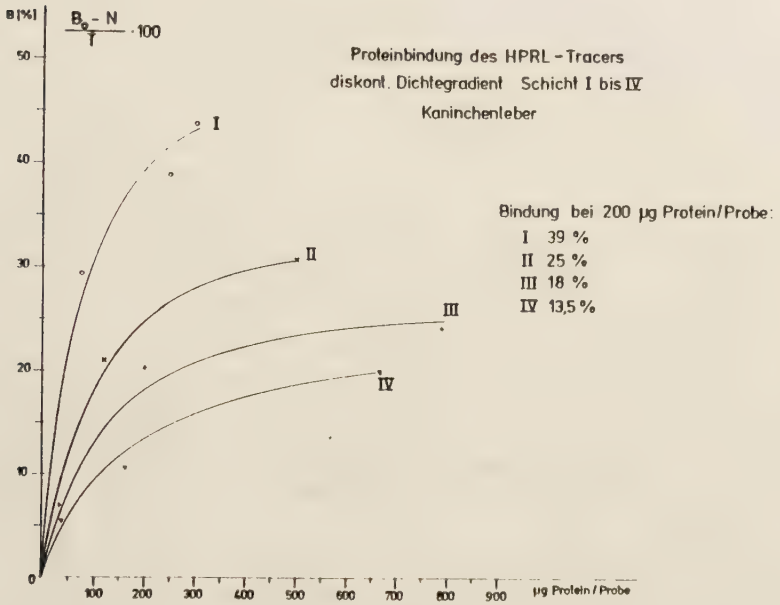

Abb.16: Bindung von ^{125}J-Prolaktin an die Schichten I-IV eines diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten mit den Konzentrationen 48%/ 45%/ 41%/ 37%.

An Schicht I wird 39% ^{125}J-hPRL pro 200 µg Protein gebunden, an Schicht II 25%, an Schicht III 18% und an Schicht IV 13,5%/200 µg Protein.

3.5.2. Vergleich der Bindung von ^{125}J-Prolaktin Tracer (markiert nach der Chloramin-T-Methode oder der Lactoperoxidase Methode) an den 100 000 g-Rückstand der Präparation nach Friesen mit der Bindung an die Schicht II des diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten (siehe 2.3.3.)

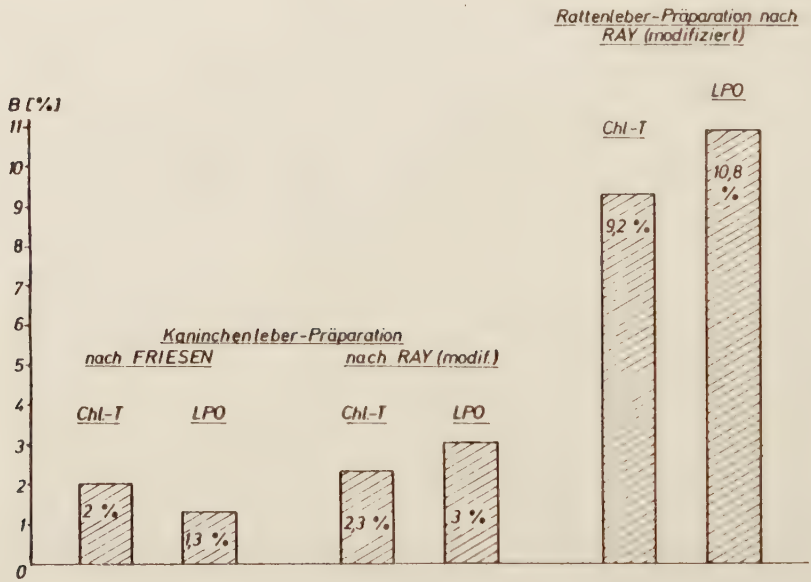

Abb. 17: Bindung des ^{125}J- Prolaktin-Tracers (markiert nach der Chloramin-T Methode (siehe 2.2.1.) und nach der Lactoperoxidase Methode (siehe 2.2.2.) an die 100000 g-Fraktion der Präparation nach Friesen, Tsushima und Posner (102) (siehe 2.1.1.) und an die Schicht II eines diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten der Kaninchen- und Rattenleberpräparation nach Ray modifiziert (91) (siehe 2.1.2.)

Der Proteingehalt aller Proben beträgt 50 µg/100µl. Die Schicht II der Kaninchenleberpräparation mit Laktoperoxidase-Tracer ist gegenüber der Friesenpräparation, gewonnen mit der Lactoperoxidase-Methode, um 1% höher, ebenso nach der Chloramin-T Methode. Die Bindung der Rattenleberpräparation, gewonnen mit der Lactoperoxidase-Methode ist um 7,8% absolut höher, bei der Chloramin-T Markierungsmethode ist die Bindung um 6,9% absolut höher.

3.5.3. Kinetik (siehe 2.3.3.2.)

	Schicht II Kaninchen		Schicht II Ratten		100000g-Rückstand Friesen/Tsushima/Posner	
	LPO	Chl.-T	LPO	Chl.-T	LPO	Chl.-T
% Bindung nach 3 h Inkubation (30°C)	3	2,3	10,8	9,2	2	1,3
% Bindung nach 15h Inkubation (30°C)	3,9	3	11,4	10,5	2,2	1,5

Tab. : Bindung von ^{125}J-Prolaktin an die Schicht II eines diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten der Kaninchenleberpräparation (siehe 2.1.2.Nr.1) und der Rattenleberpräparation (siehe 2.1.2.Nr.2) und des 100000g-Rückstands der Friesen,Tsushima,Posner-Präparation (102) (siehe 2.1.1.) mithilfe der Laktoperoxidase- und Chloramin-T-Markierungsmethode.

Der Proteingehalt der Proben beträgt 50 µg/100µl. Nach 15 Stunden ist noch keine Dissoziation eingetreten.

3.5.4. Assoziation von ^{125}J-Prolaktin an die Leberplasmamembranen der Kaninchenpräparation und Rattenleberpräparation.

3.5.4.1. Assoziation von ^{125}J-Prolaktin an die Kaninchenleberplasmamembranen.

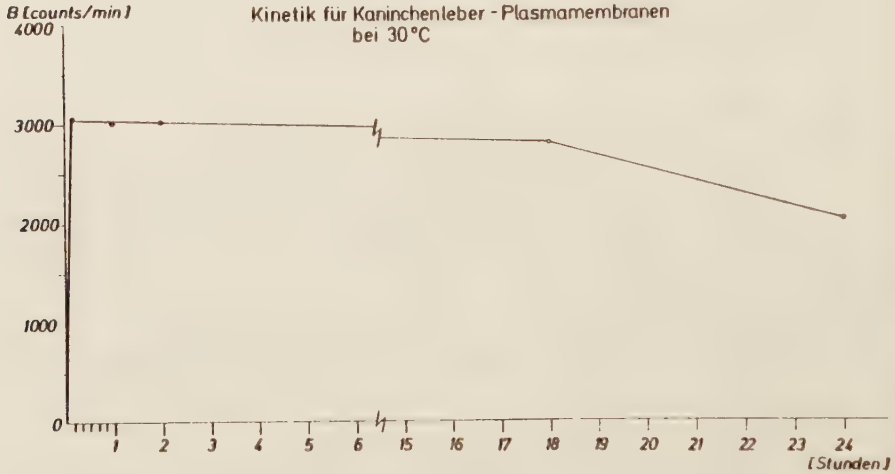

Abb. 18: Bindung des ^{125}J-Prolaktin-Tracers an die Schicht II des diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten modifiziert nach Ray (91) (siehe 2.1.2.) bei 30°C. Die maximale Bindung des ^{125}J-Prolaktin-Tracers an die Schicht II erfolgt bei 30°C nach 60 Minuten. Der Proteingehalt der Proben beträgt 150µg/100µl.

3.5.4.2. Assoziation von ^{125}J-Prolaktin an die Rattenleber-plasmamembranen.

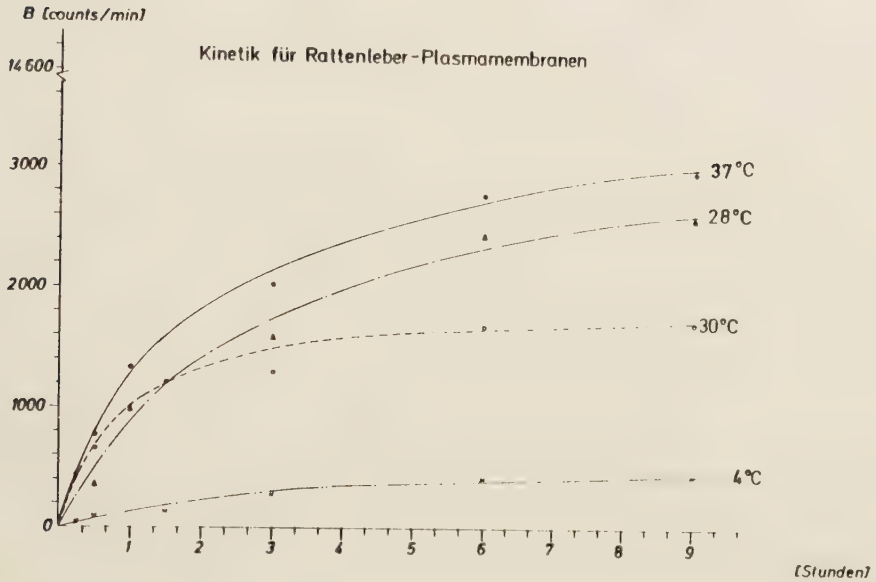

Abb. 19: Bindung von ^{125}J-Prolaktin an die Schicht II des diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten modifiziert nach Ray (91) (siehe 2.1.2.) bei 4°C, 28°C, 37° C, 30° C.

Die maximale Bindung des ^{125}J-Prolaktin-Tracers an die Schicht II erfolgt nach 120 min bei der Inkubation bei 37°C. Bei 4°C ist die maximale Bindung erst nach 4 Stunden erreicht, bei 28°C nach 180 Minuten, bei 30°C nach 145 Minuten.

3.5.5. hPRL-Standardkurve der Rattenlebermikrosomen

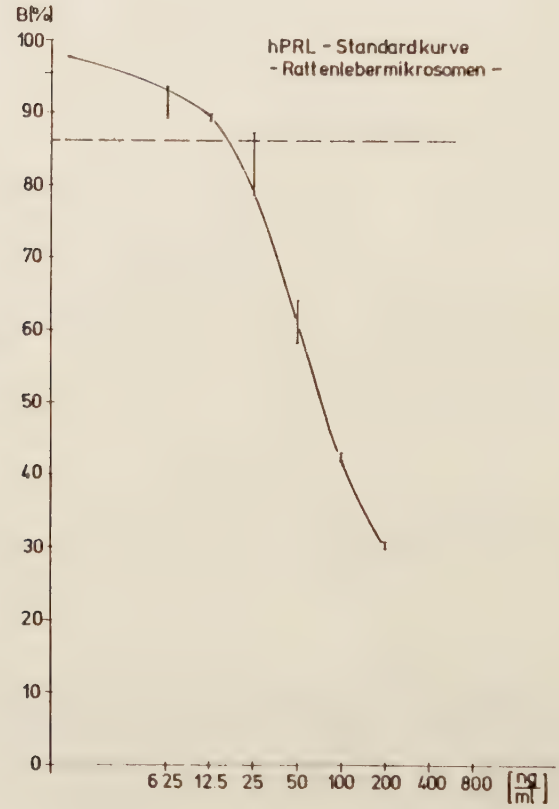

Abb. 20 : hPRL-Standardkurve der Rattenleberpräparation des diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten. hPRL-Tracer gewonnen nach der Lactoperoxidase-Methode.

Der Meßbereich der Standardkurve liegt zwischen 6,25 und 200ng. Als Standard wurde Serum einer Hyperprolaktinom-patienten mit den Verdünnungen 6,25ng/ml, 12,5ng/ml, 12,5ng/ml, 25ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml verwendet.

3.5.6. Sättigungskurve der Rattenleberplasmamembranen

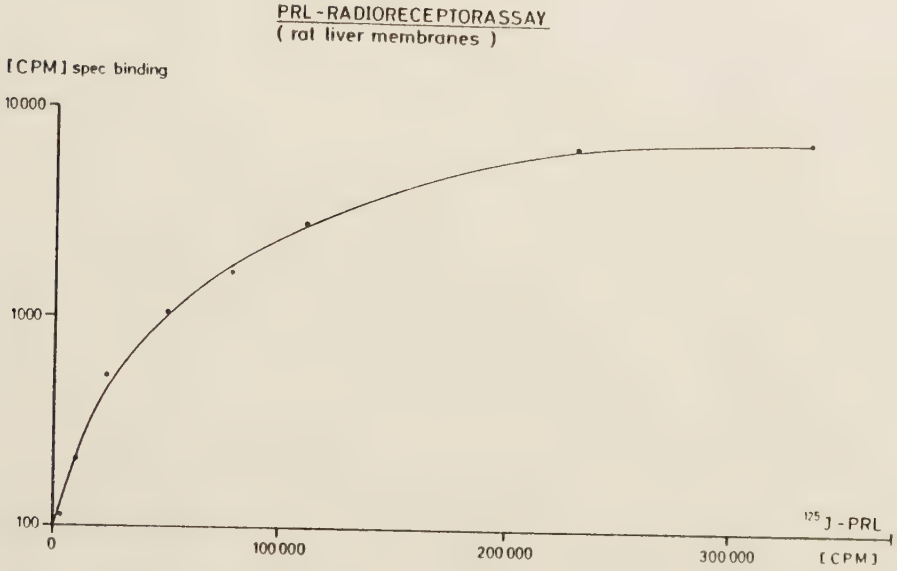

Abb. 21 : Sättigungskurve der Schicht II des diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten der Rattenleberpräparation.
Der hPRL-Tracer wurde mithilfe der Laktoperoxidase-Markierung gewonnen.

Bei einer Tracerzugabe von 200000 cpm ist die Bindungskapazität der hPRL-Rezeptoren gesättigt. Die Proben enthielten 50 µg Protein/100µl und wurden bei 30°C 6 Stunden inkubiert.

3.5.7. Scatchard-Plot der Rattenleberplasmamembranen

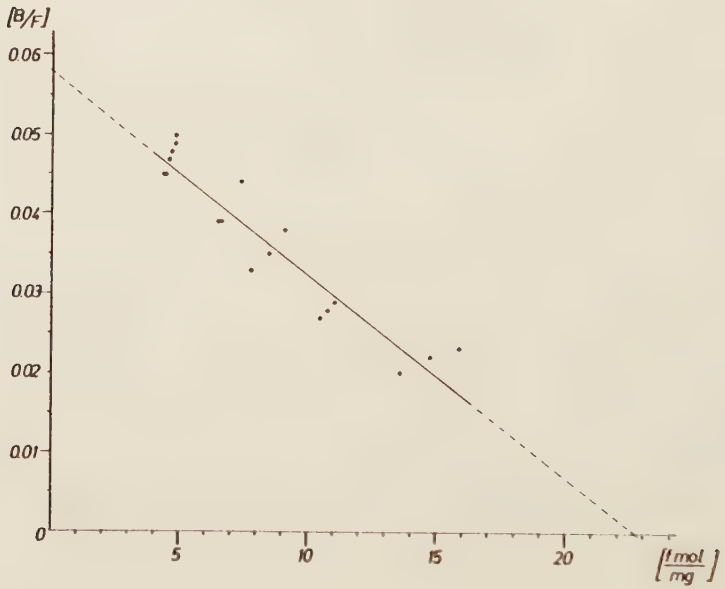

Abb. 22: Scatchard-Plot der Standardkurve (siehe 3.5.3.3.) Auf der Ordinate ist das Verhältnis gebundenes zu freiem Hormon aufgetragen, auf der Abszisse die Anzahl des gebundenen hPRL an die Rattenleberplasmamembranen. Die Affinitätskonstante (K_a) ist die negative Steigung der Geraden. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ergibt die maximale Bindungskapazität (n) von hPRL.
$K_a = 0{,}6661 \cdot 10^9$ 1/Mol

Maximale Bindungskapazität: $0{,}87137 \cdot 10^{-10}$ Mol/l = 22,6 fmol/mg Rezeptorprotein.

3.5.8. Kreuzreaktion

3.5.8.1. Kreuzreaktion (Kaninchenpräparation)

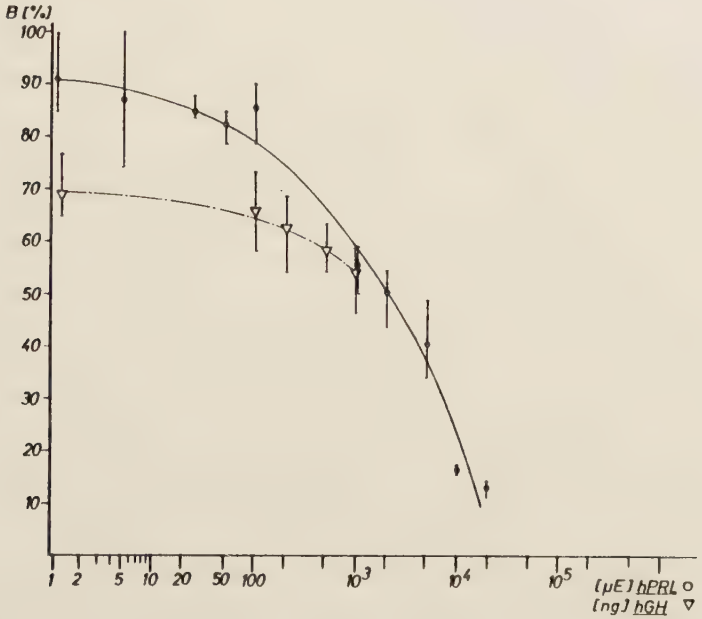

Abb. 23: Kreuzreaktion der Prolaktin-Rezeptoren von Kaninchen mit hGH.
hPRL wurde mithilfe der Chloramin-T Methode gewonnen.

▽—·—·—▽ hGH-Interferenzkurve, bei Einsatz von 1-1000 ng hGH/100µl Verdrängung von hPRL durch hGH bis zu 55% hPRL-Bindung.

o———o hPRL-Hyperprolaktinom-Serum
Bei Einsatz von 10^5µE/ml hPRL aus der Serumverdünnung können 90% der Bindung des markierten hPRL verdrängt werden.

3.5.8.2. Kreuzreaktion (Rattenpräparation)

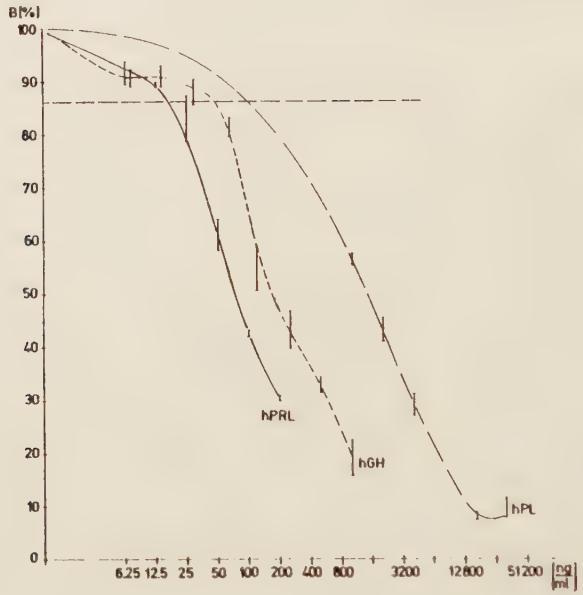

Abb. 24: Kreuzraktion der Prolaktin-Rezeptoren von Rattenlebern mit hGH und hPL.

———— Verdrängung des markierten hPRL durch Hyperprolaktinom-Serum in den Verdünnungen: 6,25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml.

– – – – – Verdrängung des markierten hPRL durch Einsatz von hGH in den Verdünnungen: 7,1ng/ml, 14,1ng/ml, 29,4ng/ml, 65,5 ng/ml, 120 ng/ml, 254ng/ml, 500 ng/ml, 1010 ng/ml.

—·—·— Verdrängung des markierten hPRL durch hPL in den Verdünnungen: 1000ng/ml, 2000ng/ml, 4000ng/ml, 8000ng/ml, 16000ng/ml, 32000ng/ml.

4. DISKUSSION

Ziel der Arbeit war der Aufbau eines Radiorezeptorassays zur Messung von biologisch aktivem Prolaktin im Serum. Die Mamma ist das Hauptzielorgan für das Hypophysenhormon Prolaktin. Die Präparation von Plasmamembranen aus der Mamma ist durch den hohen Bindegewebs- und Fettanteil der Brustdrüse erschwert. Die Ausbeute an Plasmamembranen ist gering. Posner et al (83) zeigten, daß die Leber trächtiger Ratten der spezifischen Bindung der Mamma/mg Protein ungefähr entspricht. Die Leber trächtiger Kaninchen hat eine geringere spezifische Bindung, wobei die Anzahl der Rezeptorenstellen für Prolaktin gegen Ende der Schwangerschaft ein Maximum erreicht. Wir verwendeten zur Plasmamembranpräparation die Leber von Kaninchen um den 30. Schwangerschaftstag und von Ratten um den 20. Schwangerschaftstag. Wir versuchten eine gereinigte Präparation von Leberzellplasmamembranen zu erreichen, um möglichst wenige Störfaktoren und damit eine hohe spezifische Bindung zu erreichen. Wie schon oben (siehe S. 5) berichtet, zeigt der Radiorezeptorassay eine hohe Störanfälligkeit, hat jedoch den Vorteil gegenüber dem Radioimmunoassay, biologisch aktives Hormon zu messen, während der Radioimmunoassay lediglich Antigendeterminanten mißt. Die Qualität des erstellten Radiorezeptorassays kann anhand der von Cuatrecasas geforderten Eigenschaften eines Rezeptors geprüft werden (14,15):

1. Strukturspezifität d.h. Spezifität des Rezeptors für ein Hormon.
2. Sättigbarkeit, d.h. eine begrenzte Zahl von Rezeptoren pro Zielzelle.
3. Gewebsspezifität in Übereinstimmung mit biologischer Zielzellsensibilität.
4. Hohe Affinität für das Hormon in Übereinklang mit der physiologischen Konzentration des Hormons.
5. Reversibilität der Rezeptorbindung, die zeitlich mit

dem Rückgang des physiologischen Effekts übereinstimmt, wenn das Hormon aus dem Medium entfernt wird.

6. Induktion eines second messenger

4.1. Präparation von Leberzellplasmamembranen und Qualitätsnachweis durch Enzymteste und Elektronenmikroskopie.

4.1.1. Präparationsmethoden

Es sind zahlreiche Plasmamembranpräparationen der Leber beschrieben, von Neville (77) Emmelot (27) von Herzenberg (40), Takenchi und Terayama(101) und Coleman (12). Unser Ziel war es, eine relativ einfache und rasche Präparation mit hoher Ausbeute und möglichst großer Reinheit zu finden. Bei Verwendung der Methode nach Tsushima,Friesen und Posner (102) war im Radiorezeptorassay keine Sättigung zu erreichen, was daraufhin weist, daß eine große Zahl sogenannter unspezifischer Bindungsstellen d.h. Nicht-Rezeptor-Bindungsstellen in der Präparation vorhanden sind. Die Präparationsmethode zur Isolierung von Plasmamembranen nach Neville und Emmelot erbrachten eine geringe Ausbeute an Plasmamembranen. Die später entwickelten Methoden nach Herzenberg, Takenchi, Terayama, Coleman verbesserten zwar die Ausbeute, allerdings waren die für Plasmamembranen spezifischen Enzymaktivitäten vergleichsweise niedrig. Wir hofften die Zahl der unspezifischen Bindungsstellen durch eine gereinigte Plasmamembranpräparation zu erreichen und entschlossen uns für eine Modifikation der Präparation von Ray (91), die uns eine relativ große Ausbeute und höhere Reinheit versprach. Als Homogenisiermedium wird von Ray 1mM Bicarbonatpuffer verwendet. Wir verwendeten HEPES-Puffer, wie auch Fleischer und Kervina (29), da der HEPES-Puffer, ein inerter Good-Puffer, für biologische Strukturen besonders schonend ist. Bicarbonatpuffer ist relativ instabil und der Phosphatpuffer hat den Nachteil, Proteine aus der Membran zu lösen. Als Medium verwendeten wir isotone Saccharoselö-

sung, da sonst durch den entstehenden osmotischen Schock, durch den hyposmolaren Puffer, aus der Membran auch Rezeptorprotein austreten könnte (101). Vergleiche der Enzymaktivitäten und Menge der Ausbeute an Plasmamembranen von Ray zeigten, daß in Anwesenheit von Ca^{2+} die Plasmamembranen intakt geblieben waren. Im Austausch können auch andere Schwermetallionen wie z.B. Mg^{2+}-Ionen verwendet werden wie bei Fleischer (29), die ebenso zur Stabilisierung der Plasmamembranen dienen. Als zweiten wichtigen Punkt zur Verbesserung der Ausbeute wurde bei Ray die Leber im 11-fachen Gewichtsvolumen des Leberfeuchtgewichts suspendiert. Wir verwendeten das 5-fache Gewichtsvolumen an Puffer zum Pottern und Filtrieren, dann füllten wir das Filtrat auf das 10-fache Gewichtsvolumen auf. Bei den weiteren drei Zentrifugationen mit 1000g wurde jeweils nach jeder Zentrifugation das Volumen auf die jeweilige Ausgangshälfte reduziert, wobei wir jeweils den 1000 g Rückstand weiterverwendeten und den Überstand verwarfen. Demgegenüber zentrifugierten Tsushima und Friesen (102) das Filtrat mit 1500 g, Posner(85) mit 600g, verwarfen das Pellet und gewannen die Plasmamembranen aus dem Überstand. Fleischer (29) zentrifugiert mit 960 g und verwendet das Pellet weiter. Im 1000 g Überstand befinden sich neben Zellmembranstücken auch endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Golgi-Apparat, Peroxisomen und Lysosomen. Im Pellet sind Kerne, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum neben den Zellmembranen vorhanden. Der Vorteil bei der Weiterverwendung des Pellets liegt darin, daß dort die längeren Plasmamembranstücke enthalten sind. Ray (91) verwendete zur weiteren Verbesserung der Präparation einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten mit den Konzentrationen 48%/ 45%/ 41%/ 37%. Wir übernahmen die Gradientenmethode von Ray, untersuchten jedoch zuerst unseren Rückstand R_3 (siehe 3.2.2., 3.2.3.) mithilfe eines kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten auf die Dichte seiner Proteinbestandteile. Es zeigte sich ein Proteinpeak zwischen 41% und 32% mit einem Maximum bei 37,5%(d=1,16). Die anschließende weitere Auftrennung des Peaks ergab ein Maximum der Bestandteile entsprechend der Saccharosekonzen-

tration zwischen 41% und 35% (d:1,18-1,15). Die Dichte dieser Bestandteile des Rückstand R_3 entspricht der von den meisten Autoren beschriebenen Dichte der Plasmamembranen. Beim Vergleich der weiteren Präparationsschritte zur Gewinnung der Plasmamembranen steht der wenig aufwendigen Präparation von Tsushima, Friesen und Posner mit nur zwei Zentrifugationsschritten mit 15000 g und 100000 g die sehr aufwendige Methode von Fleischer gegenüber. Fleischer stellt das 960 g-Pellet durch Zugabe von Saccharose auf den Dichtewert einer 45,7% (w/w) Saccharoselösung ein, schichtet darüber Puffer und isoliert nach der Zentrifugation die erhaltene Grenzschicht zwischen Suspension und Puffer. Diese stellt er auf 41%-Dichte ein, wiederholt den ersten Schritt, isoliert wieder die erhaltene Grenzschicht, stellt sie auf 39,4% Dichte ein und erhält jetzt nach der Zentrifugation die Plasmamembrananreicherung an der Grenzschicht zwischen der Suspension und dem Puffer. Wie oben berichtet, verwendeten wir nicht diese aufwendige Präparationsmethode von Fleischer (29), sondern orientierten uns an dem Dreischichten-Gradienten nach Ray (91). Bei der Einstellung des Rückstandes R_3 auf 48% und den darübergeschichteten Saccharosekonzentrationen von 45%, 41% und 37%, erwarteten wir aufgrund Rays Untersuchungen die größte Plasmamembrananreicherung an der Grenze zwischen 41% und 37% (=Schicht II). Unsere größte Anreicherung zeigte sich aber an der Oberfläche dieses Gradienten, der Schicht I (siehe 2.1.2.2.3.). Auftrennung der Schicht I und II anhand von kontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten hatten gezeigt, daß die Dichte der Bestandteile in Schicht II etwa einer 40-36%igen Saccharoselösung entspricht, die Schicht I einer Saccharoselösung von 39-35%, was bedeutete, daß in Schicht I noch viele Bestandteile enhalten waren, die der Dichte der Plasmamembranen entsprach, vermutlich handelte es sich um kleinere Plasmamembranstücke. Da diese Schicht I außerdem sehr fettreich, relativ dünn und schwer zu isolieren war, versuchten wir durch Ersetzen der obersten, 37%igen Saccharoselösung mit einer 35%igen Saccharoselösung noch einen Teil der Plasmamembranen dieser Schicht I in die Schicht II zu

verlagern. Es zeigte sich dann in der Schicht II die größte Anreicherung von Plasmamembranen. Da die Verteilung der subzellulären Fraktionen in geringen Grenzen schwankt, ist es notwendig, für jedes System die Konzentrationen des Dichte-Gradienten neu festzulegen. Beim diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten ist die Ansammlung der subzellulären Fraktionen in der Grenzschicht sichtbar. Beim kontinuierlichen Gradienten sind die einzelnen Fraktionen nicht so deutlich abgrenzbar. Wir verwendeten daher einen diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten mit den Konzentrationen 48%, 45%, 41%, 35% (w/w).

4.1.2. Enzymteste.

Als "Marker"-Enzyme bezeichnet man Enzyme, die vornehmlich an bestimmte Zellorganelle gebunden sind. Die Höhe der spezifischen Aktivität in bestimmten präparierten subzellulären Fraktionen kann Aufschluß über den Gehalt an diesen Zellorganellen geben. Für die Plasmamembranen sind die 5'-Nukleotidase (76,24,25,77,26,107) Galactosidase (3) und Na-K-ATPase die gebräuchlichsten Marker. Die Galaktosidase ist auch in Lysosomen lokalisiert, während die 5'-Nukleotidase vorwiegend an den Plasmamembranen sitzt, allerdings auch noch in den Kernen und im endoplasmatischen Retikulum vorhanden ist (12). Da in unserer Schicht II keine Kerne mehr zu erwarten sind, kann die 5'-Nukleotidase-Aktivität den Plasmamembranen und dem endoplasmatischen Retikulum zugeordnet werden. Als Maß für die vorhandene Verunreinigung in der präparierten Plasmamembranfraktion durch endoplasmatisches Retikulum, kann die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase (3,75) und der NADPH-Cytochrom-C-Reduktase bestimmt werden, da diese Enzyme vorallem am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind, wobei die NADPH-Cytochrom-C-Reduktase spezifischer ist. Mithilfe der Aktivität der Citrat-Synthase kann die Verunreinigung durch Mitochondrien gemessen werden. Die Citrat-Synthase sitzt an der inneren Membran der Mitochondrien. Als Markerenzym für die Mitochondrien

wird häufig auch die Succinat-Reduktase verwendet.

Wir führten den 5'-Nukleotidase-Test zuerst nach der Methode von Aronson und Touster (3) durch. Im diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten in der niedrigsten Konzentration = 37%, fanden wir die größte spezifische Aktivität der 5'-Nukleotidase: 26-36U/g. In der Schicht II, der Schicht zwischen 41% und 37% Saccharose, wurde eine Aktivität von 16-22 U/g gemessen. Die Aktivität der Schicht I betrug etwa das 3-4fache der Aktivität des Homogenats, die Aktivität der Schicht II war gegenüber dem Homogenat etwa 2-2,5-fach höher. Daraufhin ersetzten wir die 37%-Saccharose-Schicht durch eine 35%ige Saccharoselösung. Als eine spezifischere Methode zur Bestimmung der Plasmamembranen verwendeten wir zusätzlich den 5'-Nukleotidase-Test nach Gerlach und Hilby (28). Prinzip des Tests ist, daß mittels der selektiven kompletten Enzymhemmung durch Nickelionen (3,1) (siehe 3.3.2.) die Phosphatabspaltung durch unspezifische Phosphatasen von der Phosphatabspaltung durch spezifische Phosphatasen unterschieden werden kann. Wir fanden eine 4-4,7 fache Anreicherung der Enzymaktivität gegenüber dem Rückstand R_3, in der Schicht II das 3 fache gegenüber dem Homogenat und eine 1,5-2,5 fache in der Schicht I gegenüber dem Homogenat. Die Absolutwerte der spezifischen Aktivitäten liegen wie erwartet niedriger als die Ergebnisses des Tests von Aronson, was auf die spezifischere Erfassung der 5'-Nukleotidase hindeutet. Schicht II hat im 5'-Nukleotidase-Test nach Gerlach und Hilby eine Aktivität von 9,18 - 9,8 U/g, im Test nach Aronson und Touster wie oben berichtet 16-22 U/g,in Schicht I beträgt die Aktivität mit dem Gerlach,Hilby-Test 3,8-5,4 U/g im Aronson,Touster-Test 26-36 U/g.
Die anderen Grenzschichten des diskontinuierlichen Saccharose-Dichte-Gradienten ergaben folgende Aktivitäten der 5'-Nukleotidase, jeweils bezogen auf die Aktivität des Homogenats, Schicht III: 0,3 U/g, Schicht IV: 0,09 U/g, Schicht V: 0,82 U/g. Die Schicht IV enthält jeweils die geringste Aktivität.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität des 100000g-Rückstands der Präparation nach Posner (85) (Modifikation der Präparation nach Tsushima und Friesen (102)) ergab einen Wert von 6,9 U/g, was einer Anreicherung von 1,69 gegenüber dem Homogenat entspricht. Unsere Anreicherung ist etwa doppelt so groß.

Bei Posner (85) ergibt sich für die 600g-Fraktion 2U/g und für seine 100000g-Fraktion, die Plasmamembranfraktion, ein Wert von 3,8 U/g, was bedeutet, daß gegenüber der 600g-Fraktion eine weitere Anreicherung von 1,9 erreicht wird. (Keine Homogenatangabe).
Coleman (12) mißt spezifische Aktivitäten zwischen 0,5 und 1,5 U/mg in der Plasmamembranfraktion und hat damit eine 13-23 fache Anreicherung gegenüber dem Homogenat.
Kervina und Fleischer (29) haben in der Plasmamembranfraktion eine spezifische 5'-Nukleotidase-Aktivität von 0,99 U/mg gegenüber einer Aktivität von 0,036 U/mg im Homogenat gefunden, dies bedeutet eine 27-fache Anreicherung.
Emmelot (27) verwendete als Plasmamembranmarker die ATPase, weshalb wir keinen unmittelbaren Vergleich haben; allerdings berichtet er, daß in seinen Präparationen keine Cytochrom-C-Reduktase vorhanden war, er hatte also keine Verunreinigung durch endoplasmatisches Retikulum. Die hohen Anreicherungen von Coleman und Fleischer sind vorallem durch die wesentlich aufwendigeren Präparationen bedingt.

Eine niedrigere Enzymaktivität könnte allerdings auch vorgetäuscht werden, wenn die Enzyme während der Präparation Schaden leiden z.B. beim Auftauen der auf -80°C eingefrorenen Lebermikrosomen. Sind noch weitere Proteine (endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien in der gewonnenen Fraktion vorhanden, so kann dadurch die auf mg Protein bezogene Aktivität verkleinert werden. Zum anderen können unspezifische Reaktionen im Homogenat zu fälschlich erhöhten Homogenataktivitäten führen.

Ausschlußenzyme:

Die Glucose-6-Phosphatase ist ein Marker-Enzym für das endoplasmatische Retikulum (45) (siehe 2.1.1.3.5.). Wir fanden die höchsten Aktivitäten in der Schicht III (zwischen 41% und 45%) und IV (zwischen 45% und 48%) und V (48%) des Saccharose-Dichte-Gradienten. Die Schicht II enthielt jeweils 1/6-1/8 der Aktivität des Homogenats (Homogenat 191 U/g, Schicht II 25 U/g und Homogenat 548 U/g und Schicht II 90 U/g).
Ray (91) gibt etwa 21 U/g in der Plasmamembranfraktion an, in der "Smooth-Microsomen" Fraktion hingegen 366 U/g.
Coleman (12) mißt eine spezifische Aktivität von 24 U/g in der Plasmamembranfraktion, entsprechend etwa der Hälfte des Homogenats.
Kervina und Fleischer (29) messen etwa 40 U/g in der Plasmamembranfraktion und 960 U/g im Homogenat (= 1/24).
Touster (103) fand noch 7% der Menge des endoplasmatischen Retikulums des Homogenats in seiner Plasmamembranschicht.
Wie auch beim 5'-Nukleotidase-Test liegen unsere Glucose-6-Phosphatase-Werte gegenüber den sehr aufwendigen Präparationen von Fleischer und Kervina höher, etwas höher als Rays Werte, jedoch deutlich niedriger als die Werte von Coleman.
Ein spezifischeres Marker-Enzym für das endoplasmatische Retikulum ist die NADPH-Cytochrom-C-Reduktase (3) (siehe 2.1.1.4.4.). Die gemessene spezifische Aktivität in der Schicht II unserer Präparation betrug hier etwa 1/3 der des Homogenats. Das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der 100000g-Fraktion der Präparation nach Posner (85) zur Aktivität seines Homogenats lag mit 0,83 wesentlich höher.
Unserem Citrat-Synthase-Test nach waren in der Schicht II noch 1/10 - 1/15 der im Homogenat vorhandenen Mitochondrienaktivitäten erhalten, während auf der elektronenmikroskopischen Abbildung, die wir von Schicht II anfertigen ließen, keine Mitochondrien zu sehen sind. Der Grund dieser Diskrepanz ist durch die Verunreinigung mit inneren Mitochondrienmembranen zu erklären, die in unserer elektro-

nenmikroskopischen Aufnahme von Plasmamembranen nicht sicher unterschieden werden können.

4.1.3. Elektronenmikroskopie

Die von unserer Schicht II angefertigte Elektronenmikroskopie zeigt Plasmamembranen (siehe 3.4.) gestreckt und als Vesikel mit geringen Resten von endoplasmatischem Retikulum. Intakte Mitochondrien sind nicht erkennbar.

Wir haben mit unserer Präparation im Vergleich zur Plasmamembranpräparation von Posner (85) (Modifikation nach Tsushima Friesen (102)) eine aufwendigere Methode gewählt, die, wie gezeigt, größere Anreicherungen und weniger Verunreinigungen mit endoplasmatischem Retikulum zeigt. Wir haben somit einen Kompromiß gewählt zu den noch aufwendigeren Methoden von Fleischer und Kervina (29), die allerdings auch mit höheren Anreicherungen verbunden sind.

4.2. ^{125}J-Prolaktin-Tracer markiert mithilfe von Chloramin-T oder Lactoperoxidase als Oxidationsmittel

Wir verwenden im Radiorezeptorassay ebenso wie im Radioimmunoassay radioaktiv markiertes Hormon. Als Radioisotop zur Markierung von Proteohormon bietet sich J^{125} an. Zum einen besitzt J^{125} eine relativ lange Halbwertzeit (65 Tage), so daß die Berechnung von Versuchsergebnissen, die sich über mehrere Tage erstrecken, wenig beeinflußt werden. Zum anderen ist J^{125} in einem Carrier-freien Zustand, frei von reduzierbaren Stoffen und in hoher Konzentration verfügbar.
Der Nachteil der ^{125}J-Markierung ist, daß Jod normalerweise nicht Bestandteil des Proteohormons ist; bestimmte Teile des Hormons (17) sind für das Erkennen des Rezeptors, bzw. für die Einleitung der weiteren spezifischen Reaktion nach der Bindung an den Rezeptor wichtig und es könnte bei der Jodierung dieser Teile die biologische Aktivität des Hormons verloren gehen.
Es gibt verschiedene Methoden der Oxidation von J zu J^+:

1. Mithilfe von Chloramin-T, das in wässriger Lösung aktive Chlorionen bildet.
2. Mithilfe von H_2O_2 in Verbindung mit Lactoperoxidase.

Bei der Markierung kann es zur Oxidation von Methionin (durch H_2O_2 oder Tryptophan (durch J^+) und zum Zerreißen des Peptidhormons kommen (44,2).
Unser Ziel war es, eine möglichst schonende Markierung zu erreichen. Zuerst verwendeten wir die Chloramin-T Methode nach Greenwood und Hunter (42,37), dann die Methode nach Thorell und Johansson (101) mithilfe von Lactoperoxidase. Anhand der Bindungsstudien haben wir dann die verschiedenen Markierungen verglichen.
Bei den von uns durchgeführten Bindungsversuchen lag die Gesamtbindung des LPO-Tracers immer über der des Chloramin T Tracers. Die Differenz beträgt bei Einsatz der Schicht II der Kaninchenleberrezeptoren 0,7% und bei Einsatz der Posner-Plasmamembranen 0,7%. Auch Shiu und Friesen (95) berich-

ten, daß die Lactoperoxidasemetnode der Chloramin T Methode überlegen ist. Sie konnten zeigen, daß die spezifische Bindung von ^{125}J-Prolaktin nach der Hunter und Greenwood Methode wesentlich geringer ist und die unspezifische Bindung sehr rasch ansteigt.
Kuo-Yang und Ramirez finden hingegen beim Vergleich eines mit LPO-markierten oPRL-Tracers mit einem mit Chloramin T markierten Tracer eine niedrigere unspezifische Bindung und höhere spezifische Bindung des Chloramin T markierten Tracers. Die Chloramin-T Markierung wurde von Kuo-Yang allerdings modifiziert, indem er die Temperatur auf 4^{o}C senkte und die Reaktionszeit verkürzte. Nach seinen Angaben zeigten beide Tracerpräparationen bei Bindung an die Plasmamembranrezeptoren Spezifität, Sättigbarkeit und hohe Affinität.
Bei den von uns durchgeführten Bindungsversuchen lag die Gesamtbindung des LPO-Tracers immer über der des Chloramin T Tracers. Die Standardkurve der Kaninchenleberpräparation zeigt bei einer Bindung von 4,1% eine unspezifische Bindung von 0,5 - 0,8% mithilfe der Chloramin T Markierung. Bei der Standardkurve der Rattenleberpräparation konnten wir eine spezifische Bindung von 5,2% zu einer unspezifischen Bindung von 2,4% erreichen, der hPRL-Tracer wurde hier mit der Lactoperoxidase-Markierungsmethode gewonnen. Die größere Steilheit des Kurvenverlaufs der mit LPO-Tracer angefertigten Standardkurve ermöglichte eine höhere Meßgenauigkeit bei der Bestimmung einer unbekannten hPRL-Konzentration mit dem RRA.

4.3. Eigenschaften des hPRL-Rezeptors (nach Cuatrecasas)

4.3.1. Bindung und Bindungskinetik

Die Ergebnisse unserer Bindungsversuche, verglichen mit den Ergebnissen der Posner-Präparation (85), erbrachten eine höhere spezifische Bindung. Der Proteingehalt unserer Proben, wie auch der Proben der Posner-Präparation, betrug 50 µg/tube. Wir erreichten für die Schicht II eine Bindung des LPO-Tracers mit den Rattenleberplasmamembranen von 10,8% gegenüber einer Bindung der Posner-Präparation von 1,3%, bei etwa gleichem Proteingehalt. (Inkubation bei 30°C, 6 h). Shiu und Friesen (95) geben bei Einsatz von 300 µg Protein eine Bindung von 15-20% an (Inkubation 25°C, 90 min).

Die Bindung eines Hormons an seinen Rezeptor ist eine schnell ablaufende, konzentrations- und temperaturabhängige Reaktion. Bei Verwendung unserer Schicht II der Kaninchenpräparation mithilfe der Chloramin T Markierung war das Maximum der Bindung schon nach 30 Minuten erreicht, bei einer Inkubation bei 30°C. Demgegenüber ist bei der Schicht II unserer Rattenleberpräparation die maximale Bindung bei 37°C erst nach 120 Minuten erreicht, bei 30°C nach 145 Minuten, bei 28°C nach 180 Minuten und bei 4°C nach 4 Stunden. Je näher die Temperatur der physiologischen Temperatur 37°C angeglichen wird, umso schneller wird das Hormon an seinen Rezeptor gebunden. Eine Dissoziation konnte nach 24 Stunden nocht nicht festgestellt werden. Friesen und Shiu (94) berichten, daß die Dissoziation erst nach 52 Stunden meßbar ist.
Shiu und Friesen (95) erreichten bei 37°C das Maximum nach 300 Minuten, bei 23°C bei ca. 360 Minuten. Bei 0°C zeigt sich nach 360 Minuten eine Bindung von 1%. Posner (85) erreicht bei der Inkubation bei 30°C nach ca. 5 Stunden das Maximum. Olefsky, Bacon and Baur (81) erreichten bei der Inkubation bei 20°C und bei 37°C das Maximum schon nach 90 Minuten.
Roth J. (87) berichtet, daß bei der physiologischen Temperatur von 37°C das Gleichgewicht in kurzer Zeit erreicht

wird, daß allerdings auch die Dissoziation schnell einsetzt.

Wir entschlossen uns, alle Bindungsversuche bei einer Temperatur von 30°C zu inkubieren.

Die Affinitätskonstante der Bindungsreaktion wurde mithilfe des Scatchardplots bestimmt. Wir fanden eine Affinitätskonstante von $2,6644 \times 10^9$ Mol^{-1} und eine Bindungskapazität von 22,6 fmol/mg Protein .

Aragona and Friesen (4) geben bei Einsatz von 150 µg Protein eine Bindungskapazität von 40 - 48 fmol/mg Protein an. Kelly et al (51) zeigen bei Mammatumorgewebe, daß die Bindungskapazität bei prolaktinabhängigen Tumoren zwar sehr stark ansteigt, die Affinitätskonstante jedoch immer zwischen 1,7 und $2,1 \times 10^9$ Mol^{-1} beträgt. Gelato et al (35) berichten, daß auch in thyroidektomierten und ovarektomierten Rattenleberpräparationen die Affinitätskonstante 5,03 - $5,6 \times 10^9$ Mol^{-1} beträgt , während die Bindungskapazität stark abfällt.

Shiu und Friesen (95) haben anhand des Scatchard Plot verschiedene Stufen der Präparation untersucht: Im Homogenat beträgt die Bindungskapazität 25 fmol/mg Protein mit einer Affinitätskonstante von $2,2 \times 10^9$ Mol^{-1} ; die Membranenfraktion hat eine Bindungskapazität von 147 fmol/mg Protein und eine Affinitätskonstante von $3,0 \times 10^9$ Mol^{-1}, was in etwa unserer Affinitätskonstante entspricht.

4.3.2. Spezifität und Reversibilität der Bindung

Die von uns mit der Schicht II der Kaninchenleberpräparation angefertigte Standardkurve zeigt bei einer Bindung von 4,1% des zugesetzten Tracers, gewonnen nach der Chloramin T Markierungsmethode, eine unspezifische Bindung von 0,8%. Der Meßbereich der Standardkurve erstreckt sich etwa von 5-300ng hPRL/ml (= 100-6000 I.E. des URC- Standards). Der Kurvenverlauf der Standardkurve der Kaninchenleberpräparation ist jedoch wesentlich weniger steil als bei der Standardkurve der Rattenleberpräparation (siehe 3.5.4. und 3.5.3.3.). Der 50% Intercept beträgt bei Schicht II der Kaninchenleberpräparation etwa 250ng/ml, bei der Posner-Präparation (85) etwa 150ng/ml. Auch Posner (85) gibt den Kurvenverlauf der Standardkurve der Kaninchenleberpräparation gegenüber denjenigen der Kaninchenmammapräparation und der Rattenleberpräparation, die in etwa vergleichbar sind, als den am wenigsten steil verlaufenden an.Der Meßbereich liegt bei der Posner-Präparation etwa zwischen 20-300 ng/ml.
Bei unserer Kaninchenleberpräparation verdrängen 1000 ng hGH 45% der hPRL-Bindung, Posner hat bei Einsatz von 1000 ng hGH eine verbleibende Bindung von 10-12% (85).
Da die Steilheit des Kurvenverlaufs für die Meßgenauigkeit bei der Bestimmung einer unbekannten hPRL-Konzentration in einer Probe beim Radiorezeptorassay entscheidend ist und da wir für die Kaninchenleberpräparation keine Sättigung der Bindungsstellen erreichen konnten, die ja nach Cuatrecasas (14) zu den wichtigen Eigenschaften eines Rezeptors zählt, arbeiteten wir ausschließlich mit der Rattenleber weiter.
Die Standardkurve der Schicht II der Rattenleberpräparation mithilfe der Lactoperoxidase-Markierung zeigt eine spezifische Bindung von 5,29% und eine unspezifische Bindung von 2,49% bei Einsatz von 385 µg Protein/ml. Der 50% Intercept liegt bei 74,26 ng/ml, die untere Nachweisgrenze bei 16,6 ng/ml. Posner (85) gibt eine unter Nachweisgrenze von

von 20 ng/ml an und eine Bindung von 3% bei Einsatz von 150 µg Protein/tube.
Gelato et al (35) haben bei einer Gesamtbindung von 10% eine unspezifische Bindung von 2%. Der Meßbereich der Standardkurve erstreckt sich von 10 - 250 ng/ml, bei einem Proteingehalt von 300µg/tube. Gelato et al verwendeten die Präparationsmethode von Shiu and Friesen (95).
Ranke et al (86) berichten von einer Bindung von 4,4% neben einer unspezifischen Bindung von 0,44%. Ihr Meßbereich liegt etwa bei 15-300 ng/ml. Der 50% Intercept liegt bei 80 ng/ml.
Shiu, Kelly and Friesen (96) setzten 300 µg Protein/ml ein und erreichten eine Bindung von 15-20% des eingesetzten ^{125}J-hPRL; davon konnten 80% verdrängt werden, so daß eine unspezifische Bindung von 3-4% verbleibt. Die Sensitivität des Assays beträgt ohne Serum 5ng/ml, mit Serum 20 ng/ml.
Gelato (35) Ranke et al (86) und Shiu, Kelly und Friesen (96) haben bei etwa gleicher Bindung (außer Shiu,Kelly und Friesen, die das dreifache an Bindung haben) eine niedrigere unspezifische Bindung. Die Reinheit der Präparation, die wir mithilfe der Enzymtests überprüften, war verglichen mit Shiu,Kelly und Friesen höher, so daß eine geringere unspezifische Bindung hätte erwartet werden können.
Shiu et al (96) haben im Gegensatz zu uns die Filtrationsmethode angewandt, d.h. nach der Inkubation von 90 Minuten bei 25°C (wir 6 Stunden bei 30°C) und nach Zugabe von Puffer wurde der Tubeninhalt durch eine Membran (Typ WP02500, Porengröße 0,2 µl) zweimal filtriert. Eventuell könnte dadurch das freie Hormon vom gebundenen Hormon sauberer getrennt werden, das dann bei unserer Methode als nicht verdrängbares Hormon (=unspezifische Bindung) gewertet wird. hGH zeigt bei 1000 ng eine Verdrängung von 80% der Bindung.

Es ist bekannt, daß Kaninchen einen lakto- und einen somatotropen Rezeptor besitzen (95). Am laktotropen Rezeptor wird das auch laktotrope menschliche Wachstumshormon gebunden, während das bovine Wachstumshormon nicht laktotrop ist und nur an einen somatotropen Rezeptor gebunden wird.
Shiu,Kelly und Friesen (96) haben bei Einsatz von 1000ng hGH

eine Verdrängung von 80%. Ranke et al (86) können bei Einsatz von 1000 ng hGH 75% der Bindung verdrängen.
Wir haben bei Einsatz von 100 ng hPL 45% der Bindung verdrängt, bei 12800 ng hPL 90%.
Shiu and Friesen (93) haben bei Einsatz von 100 ng hPL eine Verdrängung von 70%.

4.3.3. Sättigbarkeit

Die angefertigten Sättigungskurven zeigen bei zunehmender Tracerkonzentration schließlich eine Sättigung der Bindung. Bei Verwendung unserer Kaninchenleberpräparation konnten wir keine Sättigung erreichen, weswegen wir dann ausschließlich mit Rattenlebern weiterarbeiteten.

	TSUSHIMA/FRIESEN	POSNER	EIGENE PRÄPARATION
Homogenisier-methode	Leber in 5Vol.0,3M sucrose, in Polytron-Homogenizer homogenisieren, filtrieren, Filtrat zentr. 1500g/20min.	Leber in 10Vol.0,3M sucrose in Polytron-Homogenizer homogenisieren, filtrieren Filtrat zentr. 600g/15min.	Leber in 5Vol.10mM HEPES-0,25M sucrose,0,02g% NaN_3, pH7,5 Pottern mit 60 µm Clearance, dann 32 µm, filtrieren,Filtrat auf 10 Vol. auffüllen, zentr. 1000g/15min.,Pellet in 1/2 Ausgangsvol. Puffer suspend. (3x).
weitere Zentri-fugations-schritte	Überstand zentrifugieren 15000g/20min., Überstand zentr. 100 000g/90min. Pellet in 0,025M Tris-HCL, pH 7,0 ,10mM $CaCl_2$ (1ml Puffer/ 1g Leber).	Überstand zentrifugieren 15000g/20min., Überstand zentr. 100 000g/60min. Pellet siehe Tsushima/ Friesen	R_3 in 2Vol.Puffer(Homogenisierpuffer+1mM $MgCl_2$), R_3 auf 48 % einstellen mit 70 %- sucrose, darüber 45%,41%,35%-sucrose schichten,zentr.22500 U/min., 120min. PM an Grenze zw. 35 % und 41 %.
Besonder-heiten	1500g-Überstand wird weiterverwendet, wenig aufwendig	600g-Überstand wird weiterverwendet, wenig aufwendige Präparation	HEPES-Puffer, $MgCl_2$, 1000g-Pellet wird weiterverwendet.
Ausbeute	12mg PM-Protein/g Leber	12mg PM-Protein/g Leber	5mg PM/g Lebergewebe
Marker-enzyme		5'-Nukleotidase,NADPH-Cytochrom C- Reduktase	5'-Nukleotidase, NADPH-Cytochrom C- Reduktase, Citrat-Synthase
Anreicherung	keine Angaben	1,69 geg. Homogenat	3-fach geg. Homogenat
Verun-reinigung	keine Angaben	0,83 NADPH-Cyt. C- Red.-Aktiv. in PM geg. Homog. (ER)	NADPH-Cyt C -Red.-Akt.etwa 1/3 der Akt. des Homog., Gluc.-6-P ase-Akt. 1/6 bis 1/8 der Akt. des Homogenats (ER)
Vorteile	wenig aufwendig	wenig aufwendig	wenig Verunreinigungen
Nachteile	wenig Anreicherung,Verunreinigung mit ER	wenig Anreicherung, Verunreinigung mit ER	Arbeitsaufwendiger als die Präparation nach Posner

	COLEMAN	FLEISCHER	RAY
Homogenisier-methode	Medium 0,3M sucrose, pH 7,4; pottern mit 0,39mm Clearance, 500U/min; Puffer zugeb. bis 8ml/gLeber; zentr. 1000g/10min. Pellet 3x waschen; Pellet in 3/8 Ausgangsvol. u. pottern mit 0,2mm Clearance	Leber in 5Vol. (w/v) 0,25M sucrose -10mM HEPES- pH 7,5; pottern mit 0,026 inch u. 0,012 Clearance (1000rpm); filtrieren	Medium: 0,5mM $CaCl_2$, 1mM HCO_3, pH 7,5; homogenisieren im Dounce Homogenizer; 100fach (Feuchtgew.) verdünnen; filtr. Filtrat zentr. 2600U/min. 30min Pellet homogenis., in 1/2 Vol. Puffer, zentr. 2400U/min. 15min, Pellet wieder zentr. → R_3
weitere Zentri-fugations-schritte	zentr. 1000g/10min: Überstand zentr. 3000g, Überst. zentr. 21000g/30min: Pellet überschichten mit 3-Schichten-Gradient (41%, 37%, 31%), zentr. 100000g/2h: PM an der Oberfläche der 31%-Schicht.	Filtrat zentr. 960g/10min: Pellet in 0,25M sucr.-10mM HEPES-1mM $MgCl_2$, pH 7,5, mit 2,4M sucr.-10mM HEPES-1mM $MgCl_2$, pH 7,5 einstellen auf 45,7% (w/w), darüber Homogenisierpuffer schichten, zentr. 70900 g/70min, Grenzschicht absaugen, einstellen auf 42%, darüber Puffer, zentr. 68400g/60min; Grenzschicht absaugen, einstellen auf 39,4%, darüber Puffer, zentr. 30min /231000g: PM an der Grenzschicht.	R_3 mit 70% (w/w) sucr. mischen bis 48% erreicht sind, darüb. 45%, 41%, 37%-sucr. schichten, zentr. 25000U/min, 2 h, PM zw. 37%-und 41%-Schicht.
Besonder-heiten	0,3M sucr. Puffer; 1000 g -Überstand wird weiterverwendet; PM bei Dichte < 31% erwartet.	sucrose-HEPES-Puffer; drei 2-Schichten Gradienten	0,5mM $CaCl_2$ in 1mM HCO_3-Puffer als Medium, 100-fache Verdünnung, Homogenisieren aufwendig, ein 3-Schichten Gradient
Ausbeute	0,87-2,3mg PM-Protein pro Gramm Leber	keine Angaben	1-1,5mg PM-Protein pro Gramm Leber
Marker-enzyme	5'-Nukleotidase, ATP-ase, Gluc.-6-Phosphatase, Succinate-INT-Reduktase, DNA, RNA	5'-AMP-ase, Galact. Transfer., ATP-ase, Succinate-Cyt. C, Gluc-6-P-ase, NADPH-Cytochrom-C-Reduktase	5'-Nukleotidase, Gluc.-6-P-ase, Adenyl-Cyclase, Alkaline-p-nitophenylphosphatase
Anreicherung	16 bis 24-fach gegenüber Homogenat	27-fach geg. Homogenat	5-fache Aktiv. d. 5'-Nucleotidase geg. smooth-micros.
Verun-reinigung	0,5-2 fache Gluc-6-Pase-Akt. in PM geg. Homog. (ER); 0,5-2fache DNA-Akt.	0,5-fache Aktiv. des ER-Markers in PM geg. Homogenat	0,05-fache Aktiv. der Gluc-6-P-ase in PM geg. smooth-microsomen
Vorteile	hohe Anreicherung	hohe Anreicherung	mittelgr. Aufwand/rel. gute Anr.
Nachteile	Verunreinig. durch ER, Nuclei	aufwendige Präparation Verunreinigung mit ER	viele Zentr.-Schritte bei sehr großer Verdünnung

5. Zusammenfassung

1. Die Messung von hPRL-Konzentrationen im menschlichen Serum wird mit einem Radioimmunoassay (RIA) durchgeführt. Im RIA wird die Konzentration von antigen Determinanten, die zur reversiblen Bindung an den eingesetzten Antikörper fähig sind, gemessen. Eine Aussage über die biologische Wirksamkeit der gemessenen Proteinkonzentration, d.h. hPRL-Konzentration, ist nur sehr bedingt möglich.
Der Radiorezeptorassay (RRA) mißt die Konzentration der biologischen Determinanten, d.h. der zur reversiblen Bindung an den Hormonrezeptor fähigen Stellen des Hormonmoleküls. Der RRA erfaßt die Konzentration des biologisch wirksamen Hormons in einer Probe.
Der Aufbau eines RRA war das Ziel dieser Arbeit.
2. Shiu et al haben 1973 einen RRA für hPRL beschrieben. Sie verwendeten eine grobe Mikrosomenfraktion von Rattenlebern als "Rezeptor". Wir haben eine gereinigte und angereicherte Plasmamembranfraktion von Kaninchenlebern und Rattenlebern verwendet. Die Kaninchenleberfraktion wurde verworfen, da keine Sättigung der Rezeptorbindungsstellen erreicht werden konnte.
3. Die Rezeptorbindungsstellen auf den Plasmamembranen einer gereinigten Rattenleberpräparation zeigten eine schnelle, reversible, Temperatur- und Konzentrationsabhängige Bindung von hPRL; sie waren sättigbar und von hoher Spezifität.
4. Die Affinitätskonstante für die hPRL-Rezeptorbindung betrug im Mittel $2,7 \cdot 10^{9}$ Mol^{-1}. Die Bindungskapazität betrug im Mittel 22,6 fmol/mg Protein.
5. Die Markierung des hPRL mit ^{125}J wurde sowohl mit der Chloramin-T Methode, als auch mit der Laktoperoxidasemethode durchgeführt. Der Laktoperoxidase-Tracer erbrachte eine höhere spezifische Bindung an die Rezeptorfraktion der Leberplasmamembranen.
6. Der von uns aufgebaute RRA für hPRL kann zur Messung von Prolaktinspiegeln im menschlichen Serum angewandt werden. Der Meßbereich lag zwischen 16 ng und 300ng/ml Serum. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 16 ng/ml, der 50% Intercept

liegt bei 74 ng/ml. Es handelt sich um ein heterologes System mit menschlichem Prolaktin als Tracer und Standard und Rattenleberplasmamembranen als bindendes Agens.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Ahmed, Z., Reis, L.:
The Activation and Inhibition of 5'-Nukleotidase
Biochem.J. 69:386,1958

2. Alexander, N.M.:
Oxidative Cleavage of Tryptophanyl Peptide Bonds during Chemical and Peroxidase catalyzed Uodinations.
J.Biol. Chem. 249:1946

3. Aronson, N.N.Jr, Touster:
Isolation of Rat Liver Plasma Membrane Fragments in Isotonic Sucrose.
Methods in Enzymology, Biomembranes, 47:604-617,1970

4. Aragona and Friesen, H.G.:
Specific Prolactin Binding Sites in the Prostate and Testis of Rats.
Endocrinology 96:677-684,1975

5. Baulieu, E.E., Alberga, A., Jungi:
Metabolism and Protein Binding of Sex Steroids in Target Organs: Approach to the Mechanism of Hormon Action.
Recent Prog. Horm. Res. 27:351,1971

6. Bewley, T.A.:
Sequence Comparison of Human Pituitary Growth Hormon, Human Chorionic Somatomammotropin and Ovine Pituitary Lactogenic Hormon.
Experientia 27:1368,1971

7. Birnbaumer, L., Pohl, S.L. and Kaumann, A.L.:
Receptors and Acceptors: A Necessary Distinction in Hormon Binding Studies.
In: Advances in Cyclic Nucleotide Research (Greengard. P. and Robison A.G. eds.)
Raven Press. N.Y. 4:239-281,1974

8. Bowers, C.A., Friesen, H.G., Hwang, P., Guyda, H.J., Folkers, K.:
Prolaktin and Thyrotropin Release in Man by Synthetic Pyroglutamyl-Histidyl-Prolinamide.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45:1/33,1972

9. Bryant, G.D., Greenwood, F.C.:
Radioimmunoassay for Ovine, Caprine and Bovine Prolactin in Plasma and Tissui Extracts.
Biochem. J. 109:831,1968

10. Bryant, G.D., Greenwood, F.C.:
The Concentrations of Human Prolactin in Plasma Measured by Radioimmunoassay: Experimental and Physiological Modifications.
In: Lactogenic Hormonses. (Eds: G.E.W. Wostenholme, J.Knight)
Churchill Livingstone, Edinburgh, London 1972

11. Cohen, J.B. Changeux, J.P.:
The Cholinergic Receptor Protein in its Membrane Environment.
Annu. Rev. Pharmacol. 15:83,1975

12. Coleman, R., Michell, R.H., Finean, J.B. and Hawthorne, J.N.:
A Purified Plasma Membrane Fraction Isolated from Rat Liver under Isotonic Conditions.
Biochimic. Biophys. Acta, 135:573,1973

13. Cuatrecasas, P.:
Insulin Receptors, Cell Membranes and Hormone Action
Biochem. Pharmacology, 23:2353-2361,1974

14. Cuatrecasas, P.:
Membrane Receptors.
Annu. Rev. Biochem. 43:169,1974

15. Cuatrecasas, P. and Hollenberg, M.D.:
Binding of Insulin and Other Hormons to Non-Receptor Materials: Saturability, Specifity and Apparent "Negative Cooperativity".
Biochem.Biophys. Res. Commun 62:31-41,1975

16. Canfield, M.C.J., Bates, R.W.:
Nonpuerperal Galactorrhea.
New Eng. J. Med. 273:897,1965

17. Clemm, Ch.:
Heterogenität von menschlichem Wachstumshormon und menschlichem Prolaktin.
Inaugural-Dissertation, München, 1977

18. Conway, L.W. Schalch, D.S. Utinger, R.S., Reichlin, S.:
Hormones in Human Pituitary Sinusoid Blood:
Concentration of LH and TSH.
J. Clin. Endocrinology 29:446, 1969

19. Del Pozo, E., Brun des Re, R., Varga, L., Friesen, H.G.:
Inhibition of Prolactin Secretion in Man by CB-154
(2-Br-α-ergocriptin)
J.Clin. Endocrinology 35:768, 1972

20. Ehara, Y., Siler, T., Vandenberg, G., Sinha, Y.N., Yen, S.C.:
Circulating Prolactin Levels during the Menstrual Cycle:
Episodic Release and Diurnal Variation
Amer. J. Ostet. Gynecology 117:962,1973

21. Emmelot, P. and Bos, C.J.:
A stimulatory Effect of Potassium Cyanid on the Glycerolphosphate-Dehydrogenase of Normal and Neoplastic Tissui
Biochim. Biophys. Acta, 59:495, 1962

22. Emmelot, P. and Bos, C.J.:
K^{+}-Dependent p-Nitrophenyl-Phosphatase Act of Plasma Membrane Isolation from Rat Liver.
Biochim. Biophys. Acta, 121:375, 1966

23. Emmelot, P. and Bos, C.J.:
Mg^{2+}-ATPase, (Na-K-Mg)-ATPase and 5'-Nucleotidase Activity of Plasma Membrane Isolation from Rat Liver.
Biochim. Biophys. Acta, 120:369,1966

24. Essner, W. Novikoff, A.B., Masek, B.:
Adenosintriphosphatase and 5'-Nucleotidase Activities in the Plasma Membranes of Liver Cells ans revealed by Electronic Microscopy
J. Biophys. Biochem. Cytol. 6:711, 1958

25. Ernster, L., Jones, L.C.:
A Study of the Nucleosid Tri- and Diphosphate Activities of Rat Liver Microsomes.
J. Cell. Biology 15:563, 1962

26. El-Aaser, A.A., Reid, E.:
Centrifugation of Microsomes from Liver Tissui
Abst. Fed. European Biochem. Soc., Vienna 1965

27. Emmelot, P., Bos, C.J., Benedetti, E.L. and Rümke, P.H.:
Studies on Plasma Membranes.
Biochim. Biophys. Acta, 90:126, 1964

28. Enzymteste:
Citratsynthase
In: Methoden der Enzymanalyse: H.U. Bergmeyer 1:405-409, 1974
Glucose-6-Phosphatase
In: Methoden der Enzymanalyse: H.U. Bergmeyer 1:112-113, 1974
NADPH-Cytochrom-C-Reduktase
In: Methoden der Enzymanalyse: H.U. Bergmeyer 2:623-625, 1974
5'-Nukleotidase, Nathan, Aronson
In: Methoden der Enzymanalyse: H.U. Bergmeyer 2:807-809, 1974
5'-Nukleotidase, Gerlach, Hilby
In: Methoden der Enzymanalyse: H.U. Bergmeyer 2: 809-811, 1974

29. Fleischer, S., Kervina, M.:
Subcellular Fractionation of Rat Liver.
Methods in Enzymology XXXI:1974

30. Forsyth, I.A., Edward, C.R.W.:
Human Prolactin: Its Isolation, Assay and Clinical Applicaions
Clin. Endocrinology, 1:293,1972

31. Freychet, P., Roth, J., Neville, D.M. JR.:
Insulin Receptors in the Liver: Specific Binding of ^{125}J Insulin to the Plasma Membrane and its Relation to Insulin Bioactivity
Proc. Nat. Acad. Science USA 68:1835,1971

32. Freychet, P., Brandenburg, D. Wollmer, A.:
Receptor Binding Assay of Chemically Modified Insulin.
Comparison with in Vitro and in Vivo Bioassays.
Diabetologia 10:1, 1974

33. Geiger, W., Kaiser, R. and Franchimont:
Comparative Radioimmunological Determination of Human Chorionic Gonadotropin, Human Placental Lactogen, Growth Hormon and Thyrcotropin in Foetal and Maternal Blood after Delivery.

Acta Endocrinology 68:169,1971

34. Gitler, C.:
Plasticity of Biological Membranes.
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1:51,1972

35. Gelati, M. Marshall, S., Boudreau, M., Bruni, J., Cambell, G.A., Meites, J.:
Effects of Thyroid and Ovaries on Prolactin Binding Activity in Rat Liver.
Endocrinology 98:1292-1296, 1973

36. Gliemann, J., Gammeltoft, S.:
The biological Activity and the Binding Affinity of Modified Insulin Determined and Isolated Rat Free Cells.
Diabetologia 10:105, 1974

37. Greenwood, F.G., Hunter, W.M.:
Preparation of ^{131}J-Labelled Human Growth Hormon of High Specific Radioactivity
Biochem. J. 89:89-114,1963

38. Guyda, H., Friesen, H.G.:
The Separation of Monkey Prolactin from Monkey Growth Hormon by Affinity Chromatography.
Biochem. Biophys. Res.Commun. 42:1068, 1971

39. Herington, A.C., Phillips, L.S., Daughaday, W.H.:
Pituitary Regulation of Human Growth Hormon Binding Sites in Rat Liver Membranes.
Metabolism 25:360, 1976

40. Herzenberg, L.A.:
Association of H-2 Antigens with the Cell Membrane Fraction of Mouse Liver.
Proc. Nat. Acad. Science USA 47:762, 1961

41. Hummel, B.C.W., Brown, G.M., Hwang, P., Friesen, H.G.:
Sparation of Prolactin from Growth Hormone in Human and Monkey Pituitary Preparations by Isoelectric Focusing.
In: Ed. Intern. Congress of Endocrinology, Washington D.C.
Excerpta med. (Amsterdam) TCS 256:14, 1972

42. Hunter, W.M. Greenwood, F.C.:
Preparation of Jodine: ^{131}J-Labelled Human Growth Hormon of High Specific Activity
Nature194:195, 1962

43. Jakobs, L.S., Sander, P.J., Wilber, J.F., Utinger, Daughaday, W.H.:
Increased Serum Prolactin after Administration of Synthetic Thyreotropin Releasing Hormon (TRH) in Man.
J. Clin. Endocrinology, 33:996, 1971

44. Junck, H.K.L., Kirk, Cohen, L.A.:
The Oxidative Cleavage of Thyrosyl-Peptide Bonds during Jodination
Biochemistry 8:1844, 1966

45. Kahn, C.R.:
Receptors for Peptid Hormones.
Annals Internal Medicine 86:205, 1977

46. Kahn, C.R.:
Membrane Receptores for Polypeptide Hormones
In: Methods in Membrane Biology
Ed.: Korn, E.D. New York, Plenum Press, 3:81, 1975

47. Kaplan, S.L. and Grumbach, M.M.:
Serum Chorionic "Growth Hormon Prolactin" and Serum Pituitary Growth Hormon Mother and Fetus at Term.
J. Clin. Endocrinology 25:1370, 1965

48. Kleinberg, D.L., Noel, G.L., Frantz, A.G.:
L-Dopa Suppression of TRH-Stimulated Prolactin Release in Man.
J. Clin, Endocrinology, Meta. 36:1255, 1973

49. Kleinberg, L., Noel, L., Frantz, A.G.:
Chlorpromazine Stimulation and L-Dopa Suppression of Plasma Prolactin in Man.
J. Clin. Endocrinology, 33:873, 1971

50. Kovacs, K., Horvath, E., Penz, G., Ezrin, C.:
Incidence of Prolactin Cell Adenoms of the Human Pituitary Gland. In: European Society for Clinical Investigation, Abstracts of the Tenth Annual Meeting
Rotterdam, April:22-24, 1976

51. Kelly, P.A., Shiu, R.P.C., Robertson, M.C. and Friesen, H.:
Characterization of Rat Chorionic Mammotropin
Endocrinology 96:1187-1195, 1975

52. Kelly, P.A., Posner, Tsushima, T. and Friesen, H.G.:
Studies of Insulin Growth Hormone and Prolactin Binding:
Ontogenesis, Effects of Sex and Pregnancy.
Endocrinology 95:532-539, 1974

53. Kelly, P.A., Bradley, C., Shiu, R.P., Meites, J. and
Friesen, H.G.:
Prolactin Binding to Rat Mammary Tumor Tissue.
Proc. of the Soc. for Exper. Biology and Medicine 146:816, 1974

54. Lewis, U.J.:
Factor that Affect the Fragmentation of Growth Hormon and
Prolactin by Hypophysial Proteinases.
J.Biol. Chem. 238:23330. 1963

55. Lewis, U.J., Cheever, E.V.:
Evidence for two Types of Conversion Reactions for Prolactin
Biochem. Biophys. Acta 214:498, 1970

56. Lewis, U.J., Litteria, M., Cheever, E.V.:
Growth Hormone and Prolactin Components of Diselectrophoretic
Patterns: Quantitative Determinantion of the Amount of Protein
in a Stained Band.
Endocrinology 85:690, 1969

57. Lewis, U.J., Hopkins, W.C. Cheever, E.V.:
Kinetic Study of the Deamidation of Growth Hormone and Prolactin.
Biochem. Biophys. Acta 214:498, 1970

58. Lewis, U.J. Singh, R.N.:
Recovery of Prolactin from Human Pituitary Glands
In: Human Prolactin
Eds.: J.L. Pasteels, C. Robyn.
Excerpta medica, Amsterdam, 1973

59. Lewis, U.J., Singh, R.N.P., Seavey, B.K.:
Human Prolactin: Isolation and some Properties.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44:1169, 1973

60. Lewis, U.J., Singh, R.N.P., Sinha, Y.N., Vaderlaan, P.:
Electrophoretic Evidence for Human Prolactin
J. Clin. Endocrinology, 33:153, 1971

61. Lefkowitz, F.J., Roth, J. and Pastan, I.:
Radioreceptor Assay of Adrenocorticotropic Hormone:
New Approach to Assay of Polypeptide Hormones in Plasma.
Science 170:633-635, 1970

62. Lefkowitz, R.J.:
ß-Adrenergic Receptors:
Recognition and Regulation
New Engl. J. Med. 295:323, 1976

63. Lefkowitz, R.J., Roth, J. and Pastan, J.:
Effects of Calcium on ACTH Stimulation of the Adrenal:
Separation of the Hormon Binding from Adenyl Cyclase Activation.
Nature 228:864-866, 1970

64. Lesniak, M.A., Roth, J., Gorden, P. and Avin, I.R.:
Human Growth Hormon: Radioreceptor Assay Using Cultured Human Lymphocytes.
Nature New Biol. 241:20-21, 1973.

65. Leidenberger, R. and Reichert, L.F.Jr.:
Evaluation of a Rat Testis Radioligand Receptor Assay for Human Pituitary LH
Endocrinology 91:901-909, 1972

66. Lee, C.Y. and Ryan, R.J.:
Radioreceptor Assay for Human Chorionic Gonadotropin.
J. Clin. Endocrinology Metab. 40:228-233, 1975

67. Liu, W.K., Yang, R.P. Nakagawa, Y. and Ward, D.N.:
The Role of the Amino Group in Subunit Association and Receptor Site Interaction for Ovine Luteinizing Hormon, Studied by Acylation.
J. Biol. Chem. 249:5544-5550, 1974

68. Li, C.H., Yamashiro, D.:
The synthesis of a Protein Possessing Growth Promoting and Lactogenic Activities.
J. Amer. Chem. Soc. 92:7608, 1970

69. Li, C.H., Dixon, J.S.:
Human Pituitary Growth Hormon.The Primary Structure of the Hormon: Revision
Arch. Biochem. Biophys. 146:233, 1971

70. Li, C.H., Dixon, J.S., Chung, D.:
Primary Structure of the human Chorionic Somatomammotropin (HCS) Molecule.
Science 173:56, 1971

71. Lowry, O.D., Rosenbrough, N.H., Farr, A.L., Randall, R.J.:
Protein Measurement with the Folin phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193:265, 1951

72. Li, C.H.:
Prolactin: Purification and Biochemical Characterisation
In: Method in Investigative and Diagnostic Endocrinology
Eds.: S.A. Berson, R.S. Yalow
North Holland Publishing Comp.
Amsterdam London 1973

73. Macleod, R.M., Lehmeyer, J.E.:
Studies on the Mechanism of the Dopamin-Mediated Inhibition of Prolactin Secretion.
Endocrinology 94:1077, 1974

74. Malarkey, W.B., Jacobs, L.S., Daughaday, W.H.:
L-Dopa Suppression of Prolactin in Nonpuerperal Galactorrhoe
New. Eng. J. Med. 285:1160, 1971

75. Niall, H.D., Hogan, M.L., Sauer, R., Rosenblum, J.Y. and Greenwood, F.S.:
Sequences of Pituitary and Placental Lactogenic and Growth Hormones: Evaluation from a Primordial Peptide by Gen Reduplication.
Proc. Nat. Acad. Science 68:149, 1962

76. Novikoff, A.B., Esser, E., Goldfischer, S., Reus, M.:
In: R.J.C. Harris, The Interpretation of Ultrastructure.
Academic Press, New York, 64:149, 1962

77. Neville, D.M.JR.:
Isolation of an Organ Specific Protein Antigen from Cell Surface Membrane of Rat Liver.
Biochim. Biophys. Acta, 154:540, 1968

78. Noel, G.L. Suh, H.K., Frantz, A.G.:
L-Dopa Suppression of TRH-Stimulated Prolactin Release in Men.
J.Clin. Endocrinology 36:1255, 1973

79. Novikoff, A.B.:
Cell Phyiology of Neoplasia.
University of Texas Press, Austin, Texas 25:219, 1960

80. Oppenheimer, J.H., Schartz, H.L., Surks, M.I.:
Physiological Significance of Nuclear Receptor Sites.
In: Thyroid Hormone Metabolism.
Ed.: By Harland W.A.
Orr. J.S. New York, Adademic Press, 40:189, 1975

81. Olefsky, J., Bacon, V. and Baur, S.:
Insulin Receptors of Sceleta Muscle
Metabolism, 25:179-191, 1976

82. Pastells, J.L.:
Tissue Culture of Human Hypophyses:
Evidence of a Specific Prolactin in Man
In: Lactogenic Hormones.
Eds.: GEW. Wostenholme, J.Knight
Churchill Livingstone, Edinburgh, London 1972

83. Posner, B.J., Kelly, P.A., Shiu, R.P.C., Friesen, H.G.:
Studies of Insulin, Growth Hormone and Prolactin Binding:
Tissui Distribution, Species Variation and Characterization.
Endocrinology 95:521-531, 1974

84. Posner, B.I.:
Characterization and Modulation of Growth Hormon and Prolactin Binding.
Endocrinology, 96:645-654, 1974

85. Ranke, E., Stanley, Ch. A., Renore, A., Rodbard, D., Bongiovanni, A.M.:
Characterization of Somatogenic and Lactogenic Binding Sites in Isolated Rat Hepatocytes.
Endocrinology, 99:1230-1245, 1976

86. Reid, E.:
Membrane Systems.
In: Roodyn. Ed.: Enzyme Cytology
New York, Academic Pres 321, 1967

87. Roth, J.:
Peptide Hormone Binding to Receptors:
A Review of Direct Sudies in Vitro.
Metabolism 22:1059-1073, 1971

88. Roth, J., Kahn, C.R., Lesniak, M.A., Gorden, P. Demeyts, P., Megyesi, K., Neville, D.M.Jr., Gavin, Soll, J., Frechet,P., Goldfine, J., Bar, R. and Archer, J.:
Receptors for Insulin, Prolactin and Growth Hormone.
Applications to Disease States in Man.
Rec. Progr. Horm. Res. 31:95-139, 1975

89. Rodbell, N., Krans, H.M.J., Phol, S.L. and Birnbaumer,L.:
The Glucagon-Sensitive Adenyl-Cyclase System in Plasmamembranes of Rat Liver.
Effects of Guanylnucleotides on Binding of ^{125}J-Glucagon
J. Biol. Chem. 246:1872-1876, 1976

90. Robertson, M.C. and Friesen, H.G.:
The Pufification and Characterization of the Rat Placental Lactogen.
Endocrinology 97:821-825, 1975

91. Ray, T.K.:
A Modified Method for the Isolation of the Plasma Membranes from Rat Liver.
Biochem. Biophys. Acta 196:1. 1970

92. Reichlin, S.:
Neuroendocrinology
In: Textbook of Endocrinology-
Eds.: R.H. Williams 5 th Edition
W.B. Saunder Comp. Philadelphia, London, Toronto, 1974

93. Shiu, R.P.C. and Friesen, H.G.:
Properties of a Prolactin Receptor from the Rabbit Mammary Gland.
Biochem. J. 140:301-311, 1974

94. Shiu, R.P.C., Kelly, P.A. and Friesen, H.G.:
Radioreceptor Assay for Prolactin and Other Lactogenic Hormones.
Science 180:968-870, 1973

95. Shiu, R.P.C. and Friesen, H.G.:
Solubilization and Purification of a Prolactin Receptor from the Rabbit Mammary Gland.
The Journal of Biological Chem. 249:7902-7911, 1974

96. Shiu, R.P.C., Kelly, P.A. and Friesen, H.G.:
Radioreceptor Assay for Prolactin and Other Lactogenic Hormones.
Science 180:968-970, 1973

97. Siegenthaler, W.:
Klinische Pathophysiologie, Hypothalamus und Hypophyse:
P.C. Scriba, K.v.Werder
2. überarbeite Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 283,1973

98. Scriba, P.C.:
Schilddrüsenkrankheiten
In: Endokrinologie für die Praxis, hrsg. von K. Schwarz, P.C. Scriba
Lehmann, München 1970

99. Sinha, Y.N., Selby, F.W., Lewis, U.J., Vanderlaan,W.P.:
A homologous Radioimmunoassay for Human Prolactin.
J. Clin. Endocr. 36:509, 1973

100. Sherwood, L.M.:
Human Prolactin
New Engl. J. Med. 284:774, 1971

101. Thorell, J.I., Johansson, B.G.:
Enzymatic Jodination of Polipeptides with ^{125}J to High Specific Activity.
Biochim. Biophys. Acta 251:263, 1971

102. Takeuchi, M. and Terayama:
Preparation and Chemical Composition of Rat Liver Cell Membranes.
Exper. Cell. Res. 40:32, 1965

103. Tsushima, T. and Friesen, H.G.:
Radioreceptor assay for Growth Hormone and Prolactin.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 37:334, 1973

104. Touster, O. Aronson, N.N.Jr., Dulaney, J.T. and Hendrickson, H.:
Isolation of Rat Liver Plasmamembranes.
J. of Cell Biology 47:604, 1970

105. Weiner, R.I.:
Role of Brain Catecholamines in the Control of LH and Prolactin Secretion.
In: Hypothalamic Hormones. Eds.: M. Motta, P.G. Crosignani and L. Martini
Academic Press New York, 249:253, 1975

106. Werder, K. von:
Wachstumshormon und Prolaktinsekretion des Menschen.
Urban & Schwarzenberg, Verlag München-Berlin-Wien, 1975

107. Yalow, R.S., Berson, S.A.:
Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man.
J. Clin. Invest. 39:1157, 1960

Herzlich danke ich Herrn Professor Dr. P.C. Scriba für die Aufnahme in die endokrinologische Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.Doz.Dr.K.von Werder für die Überlassung des Themas, für kritische Anregungen und für sein Interesse am Fortschritt der Arbeit.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr.M. Gottsmann für seine unermüdliche Unterstützung, seine stets wohlwollende Kritik an meiner Arbeit und seine fachlichen Ratschläge.

Für die kameradschaftliche Zusammenarbeit während der gemeinsamen Labortätigkeit möchte ich mich bei meinem Kollegen Herrn O. Lang bedanken.

Herr R. Schneider fertigte die graphischen Zeichnungen, die von Fräulein F. Haag fotographiert wurden. Bei beiden bedanke ich mich sehr herzlich.

Herrn Dr. Th. Eversmann und Herrn Schopohl danke ich recht herzlich für die hilfreiche Unterstützung.

Lebenslauf

Geboren: 18.2.1949 in Günzburg
Vater: Michael Wiedemann, selbständiger Schreinermeister
Mutter: Josefa Wiedemann, geb. Mayer

Schulbildung:
Volksschule: 1955 bis 1961 in Konzenberg/Kreis Günzburg
Realschule: 1961 bis 1965 in Dillingen
Kolleg: 1970 bis 1973 in Augsburg
Abitur: Februar 1973

Von 1965 bis 1969 Tätigkeit bei der Kreissparkasse in Günzburg, von 1969 bis 1970 Sprachkurs in der Alliance Francaise in Paris.

Hochschulbildung:

vom SS 1973 bis WS 1979 an der Ludwig Maximilian Universität München

- 1975 Ärztliche Vorprüfung
- 1976 1.Teil der Ärztlichen Prüfung
- 1978 2.Teil der Ärztlichen Prüfung
- 1979 3.Teil der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

-Innere Medizin: In der II. Med. Klinik Innenstadt
-Chirurgie: Im Kreiskrankenhaus Starnberg
-Gynäkologie: Im Städt. Krankenhaus Neuperlach

Die vorliegende Arbeit begann ich im Mai 1976 im Labor für Experimentelle Endokrinologie der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München.

Seit dem 1.8.79 bin ich als Anaesthesistin im Städt. Krankenhaus München-Schwabing tätig.